

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra biologických a lékařských věd



**Poruchy vývoje a diferenciacce gonád  
u člověka**

**Disorders of human gonadal development  
and differentiation**

**Diplomová práce**

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Vedoucí katedry: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Hradec Králové, červenec 2011

Bc. Martina Kohoutová

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny citace řádně vyznačila v textu. Veškerou použitou literaturu a podkladové materiály uvádím v přiloženém seznamu literatury a zdrojů. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 10. června 2011

Na prvním místě bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za vlídný přístup, odborné vedení, veškerý čas, poznatky a rady, které mi věnoval během experimentu i při sestavování vlastní diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat Doc. MUDr. Jaroslavu Zvěřinovi, CSc. za umožnění stáže na pracovišti Sexuologického ústavu při 1. LF UK a VFN Praha, za odborné rady a připomínky týkající se této práce.

Můj velký dík také patří Ing. Zuzaně Müllerové za pomoc při histologickém zpracování vzorků pro elektronovou mikroskopii a paní laborantce Pavlíně Lukešové za pomoc při histologickém zpracování vzorků pro světelnou mikroskopii.

## OBSAH:

Obsah.....	4
Seznam zkratk.....	6
Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
<b>1. Zadání diplomové práce – cíl práce .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Teoretická část.....</b>	<b>11</b>
2.1. Vývoj gonád a odvodných pohlavních cest.....	12
2.1.1. Zárodky mužského pohlaví.....	12
2.1.2. Zárodky ženského pohlaví.....	13
2.1.3. Vývoj mužských pohlavních vývodů.....	14
2.1.4. Vývoj ženských pohlavních vývodů.....	15
2.2. Prvopohlavní buňky.....	16
2.3. Genetická determinace pohlaví.....	17
2.3.1. SRY gen.....	17
2.3.2. TDF.....	20
2.3.3. SOX-9.....	20
2.4. Genetické poruchy.....	21
2.4.1. Poruchy vývoje gonád.....	22
2.4.1.1. Klinefelterův syndrom.....	22
2.4.1.2. Turnerův syndrom.....	23
2.4.1.3. Kompletní a nekompletní forma XX a XY gonadální dysgeneze.....	25
2.4.1.4. Pravý hermafroditismus.....	26
2.4.2. Ženský pseudohermafroditismus.....	29
2.4.3. Mužský pseudohermafroditismus.....	30
2.5. Kryptorchismus.....	32
2.5.1. Etiologie.....	32
2.5.2. Dysgenetické varle.....	34
2.5.3. Nesestoupené varle.....	34
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>35</b>
3.1. Materiál určený k analýze.....	36
3.2. Světelná mikroskopie.....	36
3.2.1. Zpracování tkáně pro světelnou mikroskopii.....	36
3.2.2. Fixace.....	36
3.2.3. Odvodnění, projasnění, prosycení a zalití do parafinu.....	37
3.2.4. Krájení a lepení na podložní sklíčka.....	38
3.2.5. Barvení.....	38
3.2.5.1. Hematoxylin – eozin.....	38
3.2.5.2. Zelený trichrom.....	40
3.2.6. Zamontování.....	42
3.2.7. Hodnocení.....	42
3.3. Elektronová mikroskopie.....	42
3.3.1. Zpracování tkáně pro zhotovení polosilných řezů.....	42
3.3.2. Zhotovení polosilných řezů.....	45
3.3.3. Barvení polosilných řezů.....	45
3.3.4. Montování řezů.....	45
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>46</b>

4.1. Histologické hodnocení preparátů.....	47
4.1.1. Hodnocení preparátů Klinefelterova syndromu.....	47
4.1.2. Hodnocení preparátů pravého hermafroditismu.....	48
4.1.3. Hodnocení dysgenetických preparátů.....	49
4.1.4. Hodnocení kryptorchických preparátů.....	49
<b>5. Diskuze.....</b>	<b>50</b>
<b>6. Závěr.....</b>	<b>53</b>
<b>7. Seznam literatury.....</b>	<b>55</b>
<b>8. Obrázkové přílohy.....</b>	<b>61</b>

## SEZNAM ZKRATEK:

FN	fakultní nemocnice
VFN	Vinohradská fakultní nemocnice
TDF	testis determinující faktor
AMH	antimüllerský hormon
SRY	pohlaví - určující faktor
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PMCs	peritubulární myoidní buňky
VECs	vaskulární endotelialní buňky
CE	coelomový epitel
KS	Klinefelterův syndrom
TS	Turnerův syndrom
CAHs	kongenitální adrenální hyperplazie
CDG	kompletní gonadální dysgeneze
DSD	částečná gonadální dysgeneze
FSH	folikulstimulující hormon
LH	luteinizační hormon
DHT	dihydrotestosteron
L1, L2	lumbální obratel 1, 2
hCG	lidský choriový gonadotropin
GnRH	Gonadotropin - uvolňující hormon
HE	hematoxylin - eozin
ZT	zelený trichrom

## ABSTRAKT:

Tato diplomová práce byla zaměřena na porovnání odchylek somatosexuálního vývoje od normální diferenciace u člověka. Popsány byly etapy normální diferenciace zevního i vnitřního genitálu včetně vývodných cest, osud prvopohlavních buněk a dále byly popsány nejčastěji se vyskytující poruchy v diferenciaci: Klinefelterův syndrom, pravý hermafroditismus, mužský pseudohermafroditismus a poruchy sestupu varlat (kryptorchismus).

Tyto poruchy dodnes představují velmi složitý diagnostický problém, jelikož genetika neodpovídá fenotypu, a dále mohou být přítomny i mozaiky.

Biopstický materiál, který byl využit k diagnostice a řešení těchto poruch, jsme zpracovávali z archivního materiálu Laboratoře poruch rané ontogeneze Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze – Podolí a z Dětské kliniky FN v Hradci Králové. Využívali jsme světelnou mikroskopickou techniku z parafinových řezů a elektronovou mikroskopickou techniku z epoxidových řezů.

Nálezy jsme konfrontovali s recentním písemnictvím týkající se této problematiky.

## ABSTRACT:

This diploma thesis is focused on the comparison between the aberration of human somatosexual evolution and the normal differentiation of human genital tract organs. The phases of a normal differentiation of the external and internal genital organs and the role of primordial germ cells were described. The most frequent disorders of differentiation such as Klinefelter syndrome, true hermaphroditism, male pseudohermaphroditism and cryptorchidism were dealt with, too.

This kind of disorders presents a very complicated diagnostic problem because a genetic structure is not related to the phenotype and furthermore mosaic aberration can appear.

The bioptical material used for the experimental part of this thesis was collected from the archive of the Laboratory of early ontogenesis of diseases at the Institute for the care of mother and child in Prague and from the Department of Pediatrics of the University hospital in Hradec Králové. Among microscopy techniques we used the light microscopy of paraffin-embedded sections and the electron microscopy of epoxide resin-embedded sections.

All results were compared with scientific literature.



# **1. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE**

Vývoj a diferenciaci zevního i vnitřního genitálu včetně vývodných cest představuje složitou kaskádu biologických dějů, které mohou být poškozeny. Může nastat patologická porucha vývojových mechanismů, která je podmíněna jak geneticky, tak epigeneticky. Tyto poruchy dodnes představují velmi složitý diagnostický problém.

Cílem této diplomové práce je histologická analýza bioptického materiálu od pacientů mužského pohlaví s poruchami vývoje gonád ve věku 2 až 12 let, který byl získán z archivního materiálu Laboratoře poruch rané ontogeneze Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze – Podolí a z Dětské kliniky FN v Hradci Králové.

Biopsie byly zpracovány jednak metodami klasické světelné mikroskopie, jednak technikou používanou pro účely elektronové mikroskopie – zhotovení polosilných řezů. Získané poznatky o struktuře a buněčných komponentách patologicky konfigurovaných varlat byly použity jako kasuistické doklady spektra vybraných poruch somatosexuálního vývoje.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1. Vývoj gonád a odvodných pohlavních cest

Základem pro vývoj pohlavní žlázy (gonády) jsou 3 základní struktury. První z nich je mezotel, který vystýlá zadní stěnu břišní dutiny. Druhou strukturou důležitou pro vývoj gonád je mezenchym, který tvoří druhou vrstvu břišní stěny pod mezotelem. Třetí strukturou jsou primordiální zárodečné buňky endodermových elementů stěny žloutkového vaku.

Ve 3. týdnu intrauterinního života vzniká proliferací mezotelu s mezenchymem genitální lišta, která dále vytváří val, do kterého vrůstají primární zárodečné provazce.

Ve 4. týdnu intrauterinního života dochází k migraci prvopohlavních – primordiálních buněk, které byly původně uloženy kaudálně ve stěně žloutkového vaku. Odtud migrují podél dorsálního mezenteria k hřebenu coelomového epitelu. Tyto zárodečné buňky se posouvají k hřebenu amoeboidním pohybem. Mohou být tedy identifikovány již za 4. týdny po fertilizaci.

Asi od 6. týdne intrauterinního života obsahují zárodečné provazce primordiální zárodečné buňky.

Mezi 5. a 6. týdnem intrauterinního života se již vyvíjí primitivní gonáda a to jako hřeben coelomového epitelu v mediální části mezonefros. Tento hřeben se skládá z kůry a dřene. Během migrace dochází k mitotickému dělení. Z kůry se vyvíjejí struktury ovariální, z dřene testikulární tubuly. U zárodků s normální ženskou chromozomální výbavou XX se kůra diferencuje ve vaječník a dřeň zaniká, naopak u mužských zárodků s genetickou výbavou XY kůra zaniká a dřeň se diferencuje ve varle. Přítomnost chromozomu Y, hlavně jeho krátkého raménka, na kterém se nachází gen pro testis determinující faktor (TDF), je nezbytná pro diferenciaci pohlaví. Faktor TDF přímo ovlivňuje dřeň indiferentní pohlavní žlázy a mění ji ve varle. Chromozom Y přímo řídí TDF, který ovlivňuje přeměnu primárních zárodečných provazců v semenotvorné kanálky. Pro přeměnu indiferentní kůry ve vaječník jsou nutné dva chromozomy X.<sup>1,2</sup>

### 2.1.1. Zárodky mužského pohlaví

V důsledku působení TDF dochází ve dřeni varlete k rozvětvení primárních zárodečných provazců a vznikají semenotvorné kanálky (*tubuli seminiferi recti et contorti*) a varlečí síť (*rete testis*). Od povrchového epitelu oddělí varlečí provazce silný vazivový bělavý obal (*tunica albuginea*), který se diferencuje na povrchu varlete.

Stěnu semenotvorných kanálků tvoří Sertoliho buňky, spermatogonie a primordiální buňky. Kanálky se postupně od sebe oddělují množícím se mezenchymem, ve kterém se diferencují Leydigovy buňky. Tyto buňky produkují již během intrauterinního života hormony testosteron a androstendion. Sekrece testosteronu je zpočátku řízena autonomně, kolem 8. – 12. týdne lidským choriovým gonadotropinem. Testosteron a androstendion jsou hormony, které stimulují indukci přeměny Wolffových vývodů a vnějších pohlavních orgánů. Již v roce 1759 byly Wolffovy vývody popsány *Casparem Friedrichem Wolffem* na kuřecích embryích.<sup>2</sup>

Testosteron pak ovlivňuje nejen vývoj druhotných pohlavních znaků, ale také dalších orgánů pohlavního systému a dalších orgánových systémů. Varlata také produkují další hormon, tzv. antimüllerský hormon (AMH), který naopak způsobí regresi Müllerových vývodů.

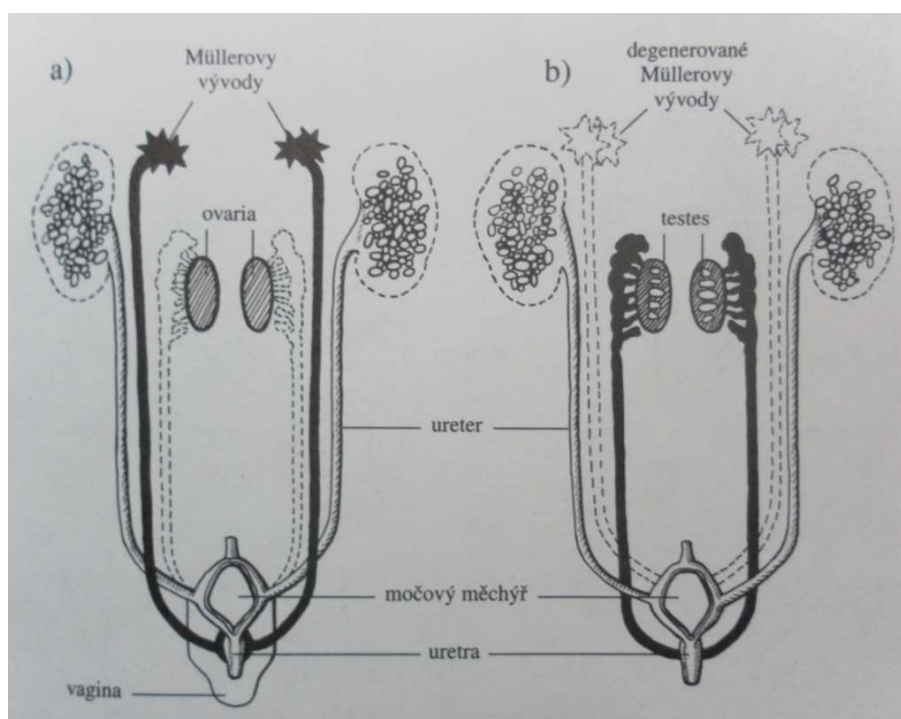
V dalším vývoji se varlečí síť napojuje na prvoledvinné kanálky (*tubuli mesonephrici*) a vznikají tak vývodné varlečí kanálky (*ductuli efferentes testis*). Kanálky se spojují s kaudálním koncem Wolffova vývodu, který je dále transformován v nadvarlečí vývod (*ductus epididymidis*). Varle se během svého růstu odděluje od zadní stěny břišní a získává svůj vlastní závěs – mesorchium. Sestupem varlete (*descensus testis*), který zpravidla trvá tři dny, se dostane do své konečné pozice.<sup>3</sup>

### 2.1.2. Zárodky ženského pohlaví

Do dřeně gonády vrůstají pod vlivem chromozomu X primární zárodečné provazce a dávají tak vzniknout vaječnickové síti (*rete ovarii*), vlastní zárodečné provazce však záhy zanikají beze zbytku. Z povrchového epitelu vrůstají do přilehlého mezenchymu sekundární zárodečné provazce. Ty do sebe současně zabírají primordiální zárodečné buňky. Stejně jako primární, tak i sekundární zárodečné provazce nemají dlouhou dobu trvání. Rozpadají se okolo 16. týdne intrauterinního života v izolované buněčné shluky s oogoniemi, tzv. prvotní vaječnickové váčky (primordiální folikuly). Počet oogonií se zvětšuje pouze v období fetálního vývoje. Po narození již žádné další nevznikají a v té době už jich vaječník obsahuje kolem dvou milionů. Moderní názory však připouštějí i jejich další dělení po porodu. Od primordiálních folikulů je povrchový epitel separován tenkým vazivovým bělavým obalem (*tunica albuginea*).

Stejně jako varle, i vaječník se odděluje od zadní stěny břišní a vytváří si vlastní pobřišnicový – vaječnickový závěs (*mesovarium*). Ten je součástí širokého děložního vazů

(*ligamentum latum uteri*), který vznikl přiblížením pobřišnicových listů v době splývání Müllerových vývodů. A stejně jako varlata se vaječníky do své konečné pozice dostávají sestupem (*descensus ovarii*). Směr a místo sestupu ukazuje vaječníkový kormidelní vaz (*gubernaculum ovarii*), který spojuje děložní konec vaječníku a dělohu. Horní část *gubernaculum ovarii* se změní ve vlastní vaječníkový vaz (*ligamentum ovarii proprium*), zatímco dolní část projde tříselným kanálem jako oblý děložní vaz (*ligamentum teres uteri*) a je zakončen ve velkých stydkých pyscích (*labia majora pudendi*).<sup>1,3</sup>



Obr. č. 1 - Vývoj gonády a gonádových vývodů Wollfových a Müllerových  
a) ženským směrem a b) mužským směrem

(převzato z: Lisá L. a kol.; Poruchy sexuální diference, kap. 1.2., 2001)

### 2.1.3. Vývoj mužských pohlavních vývodů

V 7. týdnu intrauterinního života má plod přítomny dva druhy vývodů. Prvním z nich je vývod mezonefrický (*ductus mesonephricus Wolffii*), který je důležitý pro vývoj mužského pohlavního ústrojí. Druhým z nich je paramezonefrický vývod (*ductus paramesonephricus Mulleri*), který je nezbytný pro vývoj ženského pohlavního ústrojí.

Pokud je u plodu přítomno varle, jeho Sertoliho buňky produkují antimüllerský hormon, který způsobí ústup Müllerových vývodů – paramezonefrického.

Během degenerace mezonefros se některé mezonefrické tubuly mění v *ductuli efferentes testis*. Ty se pak otevírají do *ductus mesonephricus Wolffii*. Tento mezonefrický Wolffův vývod se pod vlivem testosteronu v horní části intenzivně stáčí a vytváří nadvarle (*epididymis*) a jeho nadvarlečí vývod (*ductus epididymidis*). Ten poté dostává obal z hladké svaloviny a vzniká tak chámovod (*ductus deferens*). Měchýřkovité žlázy (*glandulae vesiculosae*, *glandulae seminales*, *vesiculae seminales*) vznikají z postranních výběžků dolních konců Wolffových vývodů. Mezi měchýřkovitými žlázami a močovou trubicí, v nejkaudálnějším úseku Wolfova vývodu, vzniká jako konečná část chámovodu vstříkovací vývod (*ductus ejaculatorius*). Z močové trubice vybíhají do okolního mezenchymu endodermové výběžky, které jsou základem žlázového epitelu předstojné žlázy (*prostata*, předstojnice). Hladkou svalovinu prostaty spolu s vazivovým stroma vytvoří sousední mezenchym.<sup>1-2, 4</sup>

#### 2.1.4. Vývoj ženských pohlavních vývodů

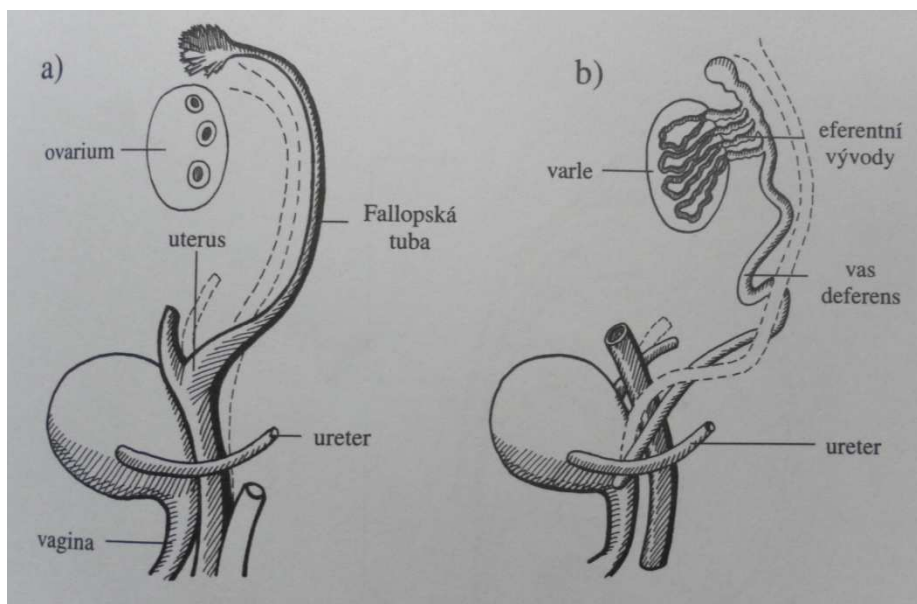
Paramezonefrické vývody sestupují mezi mezonefrickým vývodem a coelomovým epitelem do zárodečného hřebene. V dolní třetině pak paramezonefrický vývod přechází přes mezonefrický, kde se spojuje s druhostranným vývodem. Vyvíjí se tak Müllerovy vývody, které hrají zásadní roli ve vývoji pohlavních cest. Vývoj těchto duktů poprvé popsal J. Müller v roce 1830 v díle *Development History of Genital Organs*. Primární pohlavní diferenciaci u ženského pohlaví není závislá na hormonech. Pokud je přítomno ovarium nebo vazivový pruh, chybí sekrece fetálních testikulárních hormonů – antimüllerského hormonu (AMH). Müllerovy vývody tak nezanikají, ale po spojení se dále vyvíjejí v ženské vnitřní pohlavní ústrojí i s horní třetinou vaginy. Z horních, nesrostlých konců Müllerova vývodu vznikají vejcovody (*tubae uterinae*). Z dolních, srostlých částí vzniká společný základ dělohy a horní části pochvy (*primordium uterovaginale*). Z okolního mezenchymu vznikají další vrstvy stěny dělohy (*endometrium*, *myometrium*). Ze dvou základů - *primordium uterovaginale* a *sinus urogenitalis* vzniká pochva. Poševní lumen je od *sinus urogenitalis* oddělen panenskou blánou (*hymen*), a to od pozdní fetální doby.<sup>1,2,4</sup>

## 2.2. Prvopohlavní buňky

Prvopohlavní buňky neboli gonocyty jsou velké světlé buňky bohaté na glykogen a alkalickou fosfatázu. Jádru mají velké, kulaté, měchýřkovité. Jsou patrné jako souvislá skupina v entodermu žloutkového vaku od konce 2. týdne vývoje. Při tvorbě kaudálního střeva a ohýbání zárodku se dostávají do embrya, mitoticky se množí a migrují do *plica genitalis*, kde osidlují proliferující povrchový epitel gonády. Prvopohlavní buňky se odlišují od somatických buněk dvěma vlastnostmi. První z nich je snížený počet chromozomů na polovinu při jejich diferenciaci. Druhou vlastností je vznik biologického systému schopného vývoje v nového jedince po splynutí dvou pohlavních buněk. Během migrace buněk probíhá mitotické dělení. Testikulární tubuly se vyvíjejí z dřene, struktury ovariální pak z kůry. Gonocyty se diferencují u mužského plodu ve spermatogonie, u ženského v oocyty.

Zárodečné buňky vytvářejí u plodů ženského pohlaví provazce kortikální vrstvy, kde dochází k proliferaci oocytů. Počet oogonií v ovariu je v 5. měsíci intrauterinního života kolem 7 milionů. Postupně ale dochází k jejich úbytku a jejich počet se tak v pubertě pohybuje okolo 20 000. Z epiteliálních buněk se tvoří folikulární buňky. Jejich úkolem je výživa oogonia. Dále se přeměňují na buňky granulózní.

U mužských plodů se vytváří podpůrné buňky seminiferálních kanálků ze somatických buněk zárodečných provazců. Tyto buňky vyživují spermatogonie a podílí se na jejich vývoji.<sup>4,5</sup>



Obr. č. 2: Transformace gonády a) ženským směrem, b) mužským směrem (převzato z: Lisá L. a kol.; Poruchy sexuální diference, kap. 1.2., 2001)



## 2.3. Genetická determinace pohlaví

Pohlavní diferenciaci je striktně řízena geneticky. Hlavní rozdíl mezi mužským a ženským pohlavím je v charakteristické kombinaci chromozomů. Chromozomy účastníci se determinace pohlaví se nazývají pohlavní chromozomy neboli heterochromozomy. Kromě pohlavních chromozomů se na determinaci pohlaví podílí i další mechanismy, a to jak genetické, tak i negenetické.

Mužské pohlaví je determinováno 46 chromozomy, a to XY (46,XY), zatímco ženské pohlaví určuje pár chromozomů XX (46,XX). Rozdíl v kombinaci chromozomů se začíná projevovat již od fertilizace. U mužů je oocyt fertilizován spermatickou buňkou vztahující se k chromozomu Y, zatímco u žen je to spermatická buňka vztahující se k chromozomu X. Oocyty vždy obsahují chromozom X.

Chromozom Y je menší než chromozom X a obsahuje méně genů. Genetická nerovnost mezi chromozomy X a Y je kompenzována heteropyknotickou inaktivací více než jednoho z chromozomů X, pokud dva chromozomy X jsou přítomny bez buněčného jádra.<sup>6</sup>

V normální (46,XX) buňce je inaktivace náhodný proces ovlivňující otcovské odvozené X chromozomy u 50 % buněk a mateřské odvozené X chromozomy u zbytku buněk. Vzhledem k tomu, že k inaktivaci dochází ve stadiu blastocysty, zdá se, že pohlavní rozdíly jsou vyjádřeny velmi brzy a že blastomery 46,XY se dělí rychleji než blastomery 46,XX.<sup>7</sup> Pokud jsou v buněčném jádře přítomny více než dva chromozomy X, pak množství chromatinu X koresponduje s množstvím chromozomu X minus jedna.

Malá distální část heteropyknotického chromozomu X však inaktivaci nepodléhá. Tato část představuje pseudoautosomální segment chromozomu X, který obsahuje 2,5 megabází, homologní k pseudoautosomálnímu segmentu lokalizovaném na distální části krátkého raménka chromozomu Y. Během meiosis, pseudoautosomální segment X a Y chromozomového páru tvoří chiasmata, která umožňují výměnu genů.<sup>6</sup>

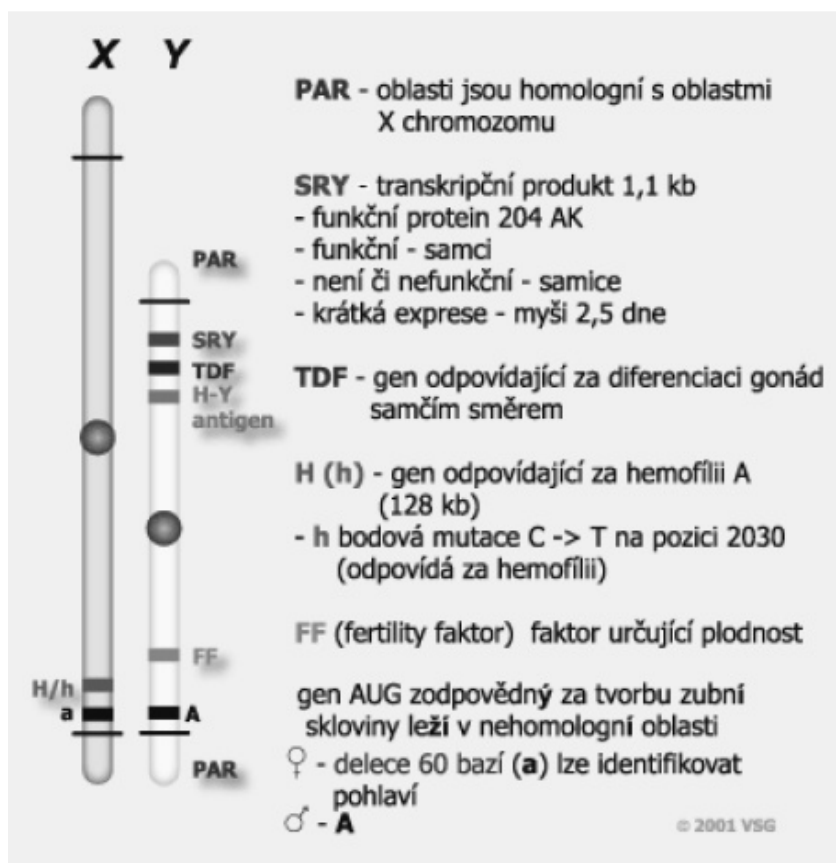
Pro determinaci mužského pohlaví je klíčový gen SRY, který se nachází v těsné blízkosti párových oblastí chromozomu X a Y. Na tomto genu závisí kaskáda dějů vedoucí k vývoji mužských pohlavních orgánů.<sup>8</sup>

### 2.3.1. SRY gen

S ohledem na pohlavní diferenciaci obsahuje normální chromozom Y gen SRY (sex – reversal Y), neboli pohlaví - určující faktor, který vyvolává testikulární diferenciaci.<sup>9-11</sup>

Gen SRY je lokalizován na krátkém raménku chromozomu Y v regionu (Yp 21) a obsahuje domény z 80 aminokyselin, které se váží k DNA. Gen SRY aktivuje řetězec dalších navazujících genů souvisejících s testikulární kaskádou. Ačkoliv gen SRY by mohl být mitotický regulátor, není to přímo zahrnuto v testikulární diferenciaci. Testikulární vývoj je možný i v nepřítomnosti SRY u některých 46,XX mužů a u některých pravých hermafroditů.

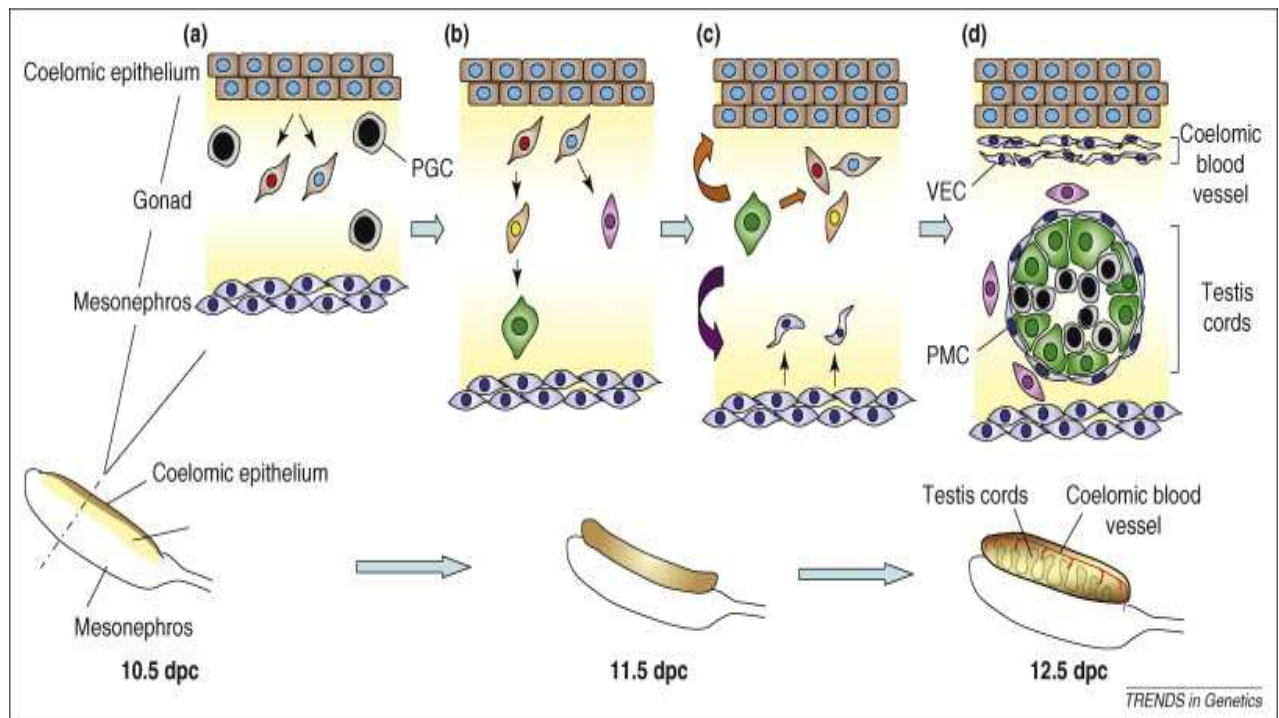
Přítomnost chromozomu Y v interfázi buněčného jádra se projevuje přítomností chromatinu Y. Dlouhé raménko chromozomu Y je tvořeno malým shlukem silně fluorescentního chromatinu, který se označuje jako chromatin Y. Jeho přítomnost ale neprokazuje přítomnost genu SRY.<sup>6</sup>



Obr. č. 3: Schéma chromozomu X a Y s lokalizací genů

(převzato z: [http://user.mendelu.cz/urban/vsg\\_1/mendel/pdf/15\\_genetika\\_pohlavi.pdf](http://user.mendelu.cz/urban/vsg_1/mendel/pdf/15_genetika_pohlavi.pdf))

Stále není jasné, jak je exprese genu SRY regulována.<sup>12</sup>



Obr. č. 4: Organizace buněk během vývoje testis

(převzato z: Sekido R., Lovell-Badge R., Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge, Trends Genet, Vol. 25, 2009, Pages 19-29)<sup>12</sup>

Dospělé varle se skládá ze zárodečných buněk a z buněk somatických. Později jsou rozděleny do třech hlavních typů buněk: Sertoliho buňky, Leydigovy buňky a buňky spojující tkáň, hlavně peritubulární myoidní buňky (PMCs) a vaskulární endotelialní buňky (VECs). Na obrázku č. 4 lze pozorovat, jak jsou buňky organizované během vývoje varlete:

- Varle vychází z pohlavního hřebenu, který je prvně rozpoznán jako základní coelomový epitel (CE) přiléhající k mezonefros.
- Prvopohlavní buňky (zobrazeny černě) migrují do gonády. Coelomové buňky (zobrazeny světle modře) proliferují a některé dceřiné buňky migrují do hřebene.
- Část těchto dceřiných buněk vybudí SRY a stanou se tak prekuzory Sertoliho buněk (zobrazeny červeně). Zbylé buňky dorostou do intersticiálních buněk a pravděpodobně zahrnují i buňky Leydigovy (zobrazeny růžově). Brzy poté, co dojde k expresi SRY se stane gen SOX-9 zcela regulován v prekuzorech Sertoliho buněk (zobrazeny žlutě). SOX-9 potlačí expresi SRY v okamžiku, kdy dosáhne kritické hodnoty, kterou tvoří SOX-9 singl-pozitivní buňky (zobrazeny zeleně). Poté tyto SOX-9 pozitivní buňky uvolňují signální molekuly, které

posílí jejich SOX-9 expresi a přimějí sousední buňky, včetně CE buněk, k proliferaci (oranžová šipka na obrázku). Tento děj zvyšuje počet prekursorů podpůrných buněk, které jsou generovány, a proto schopné vyjadřovat SRY. Tento nepřímý regulační cyklus je nutný k získání dostatečného množství Sertoliho buněk, které vytváří varle. SOX-9 pozitivní buňky také indukují buněčnou migraci z mezonefros (modrá šipka) a tyto buňky (zobrazeny modře) zahrnují především vaskulární endoteliální buňky (VECs), které se seskupují, aby vytvořily coelomové cévy charakteristické pro varle.

d) Ve vazech varlete se SOX-9 pozitivní buňky stanou Sertoliho buňkami obklopující zárodečné buňky.

V určitých situacích může také dojít k mutaci v genu SRY. Tato mutace je často asociovaná s 46,XY kompletní gonadální dysgenezí (CDG). V ojedinělých případech může být spojována mutace tohoto genu s 46,XY částečnou gonadální dysgenezí (46,XY DSD – disorder of sex development).<sup>13</sup>

### 2.3.2. TDF (testis - determinující faktor)

Testis determinující faktor byl klonován v roce 1990.<sup>2</sup> Dle Sinclaira se vyskytuje u všech savčích mužských plodů.<sup>14</sup> Hawkins určil, že tento gen zaujímá méně než jednu kilobazi DNA, má pouze jeden exon, patří do HMG boxu (High Mobility Group) a obsahuje 204 aminokyselin.<sup>15</sup>

Dnes je známo velké množství mutací tohoto genu, hlavně v DNA vazebné doméně HMG boxu. U čisté gonadální dysgeneze (46,XY) se předpokládalo, že tyto mutace jsou zodpovědné za vznik tohoto onemocnění. Pouze u 15 – 20 % pacientek byla nalezena mutace genu SRY. Avšak tyto nálezy nebyly zcela objasněny. Může se také jednat o mutaci dalších faktorů, které se podílejí na regulaci SRY.<sup>2</sup>

### 2.3.3. SOX-9

Gen SOX-9 je lokalizován na dlouhém raménku 17. chromozomu (q24). Je přítomný ve vyvíjejícím se testisu a kostech. Podle Hawkinsa, mají geny SOX asi 60 % aminokyselin identických s SRY.<sup>15</sup> Gen SOX-9 interferuje s genem SRY. Také patří do skupiny HMG boxu a mutace bývají nejčastěji v DNA vazebné doméně. Pokud dojde k mutaci těchto genů, naruší

se testis determinující funkce SRY a dochází tak k poruchám sexuální diferenciaci. Kromě toho může také tato mutace způsobit vzácné kostní onemocnění kampomelickou dysplázií. U mužů se vyskytují testikulární dysgeneze, u žen nejednoznačné zevní genitálie. V 80 % případů je přítomný rozštěp patra. U homozygotů je tento syndrom letální.<sup>2,6</sup>

## 2.4. Genetické poruchy

Autoři Grumbach M. M. a Conte F. A. klasifikovali poruchy sexuální diferenciaci.<sup>16</sup>

Upravená klasifikace je přehledně zobrazena v následující tabulce:

1. PORUCHY GONADÁLNÍ DIFERENCIACE		
a) Klinefelterův syndrom		
b) Turnerův syndrom		
c) kompletní a nekompletní forma XX a XY dysgeneze gonadální		
d) pravý hermafroditismus	<div>- 46,XX/46,XY    - 45,X/46,XY    - 46,XX</div> <div>- 46,XX/47,XXY    - 46,XY</div>	
2. ŽENSKÝ PSEUDOHERMAFRODITISMUS		
a) vliv androgenů	<div>- vrozená adrenální hyperplazie</div> <div>- deficit P 450 aromatázy</div> <div>- vliv androgenů a syntetických progestinů přenesených z mateřské cirkulace</div>	
b) jiné teratogenní faktory (často spojené s malformacemi intestinálními a urinárními)		
3. MUŽSKÝ PSEUDOHERMAFRODITISMUS		
a) porucha odpovědi testikulární tkáně na hCG a LH		
b) vrozené vady syntézy testosteronu	<div>- deficit enzymů podílející se na syntéze kortikosteroidů a testosteronu</div> <div>- deficit enzymů podílející se na syntéze testosteronu v testes</div>	
c) defekty v cílových orgánech	<div>- rezistence na androgeny</div> <div>- defekty metabolismu testosteronu v periferních tkáních, deficit 5α- reduktázy</div>	
d) dysgenetický mužský pseudohermafroditismus	<div>- XY gonadální dysgeneze</div> <div>- X/XY mozaika se strukturálně abnormálním Y chromozomem</div> <div>- Denysův-Drashův syndrom (mutace WT-1)</div> <div>- WAGR syndrom (delece WT-1)</div> <div>- kampomelická dysplazie (mutace SOX-9)</div> <div>- mutace SF-1</div>	

	- testikulární regresní syndrom
e) defekty v syntéze, sekreci nebo odpovědi na AMH	
<b>4. NEKLASIFIKOVANÉ FORMY ABNORMÁLNÍHO POHLAVNÍHO VÝVOJE</b>	
a) u mužů: hypospadie, obojetný zevní genitál u XY mužů s četnými vrozenými anomáliemi	
b) u žen: absence nebo nenormální vývoj vaginy, dělohy a vejcovodů (syndrom Rokitanského-Kusterův)	

Tab. č. 1 : Klasifikace poruch sexuální diferenciacce.

#### 2.4.1. Poruchy vývoje gonád – dysgeneze

Mezi poruchy vývoje gonád neboli dysgeneze řadíme nejčastěji poruchy, které vznikají buď v důsledku vzniku nesprávného počtu pohlavních chromozomů, nebo při poruše určité části pohlavního chromozomu. <sup>2</sup>

##### 2.4.1.1. Klinefelterův syndrom (KS)

Klinefelterův syndrom je genetické onemocnění způsobené chromozomální aneuploidií. Byl popsán rakouským endokrinologem *Henrym Klinefelterem*, který poprvé jako vedoucí studie popsal tento syndrom v „Journal of Clinical Endocrinology“ v roce 1942. <sup>17</sup>

Tato porucha je charakterizována zvýšeným počtem chromozomů. Nejčastější karyotyp je 47,XXY. Právě přítomnost dvou chromozomů X vede k poruše vývoje seminiferálních kanálků. <sup>18</sup>

Pacienti s Klinefelterovým syndromem tvoří asi 1 % mužské populace s poruchou fertility. U novorozenců chlapců je incidence udávána 1 : 1000-2500. <sup>2</sup> Tento syndrom je v andrologické praxi zastoupen nejčastěji. <sup>19</sup>

Zajímavý náález uvádí *Wikström A. M. a Dunkel L.* Během dětství a také během časně puberty jsou hladiny hypofyzárních hormonů relativně normální, avšak v období „střední puberty“ se hladiny hormonů folikulstimulujícího – (FSH) a luteinizačního – (LH) zvyšují na hypergonadotropické hladiny, inhibin B klesá na nedetekovatelné hladiny a hladiny testosteronu po několika zvýšeníích klesají na normální hladinu, jako u zdravého dospělého muže. Proto se většina dospělých mužů trpících Klinefelterovým onemocněním jeví jako čistě hypergonadotropní s různou mírou deficitu androgenů. K prevenci příznaků a deficitu androgenů se často používá substituční terapie testosteronem. Testikulární biopsie

prepubertálních chlapců s KS prokázaly zachování semenotvorných kanálků se sníženým počtem zárodečných buněk, Sertoliho a Leydigovy buňky se jeví normální. Varlata dospělého muže se vyznačovala rozsáhlou fibrózou, hyalinizací seminiferních kanálků a hyperplazií intersticia. I přesto se v tubulech mohou objevovat ložiska spermatogeneze.<sup>20</sup>

U KS dochází nejčastěji k narušení vývoje varlat, poruchám plodnosti a dalším psychickým a fyzickým změnám. Na druhou stranu i jedinci takto chromozomálně vybavení mohou být zcela bez příznaků, je-li příčinou genetická mozaika.<sup>17</sup>

V období puberty dochází k normálnímu nebo mírně zpožděnému pohlavnímu vývoji sekundárních pohlavních znaků. Z klinických známek mohou být přítomny anomálie zevního genitálu jako hypospadie, mikropenis, kryptorchismus. Někdy dochází i k poruchám chování či mentální retardaci. Testes zůstávají malé, na pohmat tuhé. Postava bývá eunuchoidní, kostní věk bývá opožděn. Po pubertě se objevuje gynekomastie. Někdy můžeme nalézt degenerativní stigmata na kostře jako *cubitus valgus*, *coxa valga*, *pectus excavatum*, krátký 4. metakarp, gotické patro, mikrognatii, případně vrozené srdeční vady. Výjimečně mohou být muži fertilní, což bývá způsobené hyelinizací seminiferních kanálků. Mnohdy se také rozvíjí osteoporóza.<sup>18,21</sup>

#### **2.4.1.2. Turnerův syndrom (TS)**

Turnerův syndrom byl poprvé popsán v roce 1938 v článku amerického endokrinologa *Henryho Turnera*.<sup>22,23</sup>

TS je jedním z nejčastěji se vyskytujících chromozomálních onemocnění a zároveň nejčastější genetické onemocnění u žen. TS je charakterizovaný monozomií chromozomu X. Bývá přítomný jeden funkční X chromozom, další chybí nebo má nenormální funkci. Typickým karyotypem je 45 X; 45 X/ 46 XX nebo XY mozaika.<sup>17,24-26</sup>

Lze říci, že u TS jde buď o delecii části krátkého (p-) nebo dlouhého (q-) raménka X chromozomu. Druhou možností je, že se jedná o kruhový chromozom, který vznikne delecí obou konců X chromozomu a následně dojde k jejich vzájemnému spojení. Třetí možností je pak izochromozom, kdy dojde k transversálnímu přerušení a duplikaci krátkého nebo dlouhého raménka se ztrátou zbývajících částí.<sup>2</sup>

TS má incidenci 1 : 2500-5000 u narozených dívek.<sup>27</sup>

U Turnerova syndromu existuje široké spektrum klinických znaků. Patří sem poruchy růstu a poruchy skeletu, jako je malá postava, široký krk, valgózní postavení v lokti,

gonadální dysgeneze, sexuální infantilismus, lymfedémy a nízko nasedající vlasová hranice.<sup>23</sup>

Dalšími klinickými příznaky mohou být malformace systému uropoetického, kardiovaskulárního, kostního, poruchy smyslových orgánů, poruchy pubertálního vývoje, sklony k obezitě, infekce respiračního systému, metabolické odchylky, neurokognitivní poruchy (problémy s krátkodobou pamětí a koncentrací), autoimunitní poruchy (poruchy štítné žlázy, choroby gastrointestinálního traktu, kolitidy, výskyt alopecie, revmatoidní artritida, *myasthenia gravis*, Addisonova choroba).<sup>28</sup>

Základní endokrinopatií je selhání funkce ovarií s deficitem produkce 17 $\beta$ -estradiolu a progesteronu, a s tím i chybění sekundárních pohlavních znaků.<sup>29</sup>

Díky patologickému karyotypu dochází během diferenciac gonády k dysgenetickému vývoji. Dívky s TS mají při narození stromální fibrotické změny v ovariální tkáni. Vnitřní pohlavní ústrojí je normální ženského typu. Jelikož ale chybí sekrece pohlavních hormonů, nedochází tak k vývoji a růstu dělohy i celého vnitřního pohlavního ústrojí ani k rozvoji sekundárních pohlavních znaků. V prvních třech měsících gestace je ovariální tkáň morfoloicky normální. Později ale rychle dochází k degeneraci primordiálních zárodečných buněk. Kolem 10. roku života dívek s TS se objevuje nefunkčnost ovariální tkáně. Právě v této době dochází ke zvýšení sekrece FSH a LH. U 95 - 98% pacientek se vyskytuje amenorea.<sup>30</sup>

V souvislosti s malou postavou byly detegovány geny na distálním konci krátkého raménka chromozomu X u pseudoautozomální oblasti. Tyto geny byly označeny jako SHOX a PHOG.<sup>30,31</sup>

U TS jsou velmi časté nefrourologické malformace, jejich diagnostika a sledování napomáhá snížení nemocnosti pacientek s tímto syndromem. Proto byla v Garrahanské nemocnici v Buenos Aires nedávno provedena retrospektivní studie s cílem analyzovat nefrourologické patologie u 72 dívek s TS v období 1989 až 2008. Prevalence nefrourologického postižení byla u 33 % pacientek. Nejčastějšími nálezy byly malformace močového systému, a to buď izolované (42 %) nebo asociované s renálními malformacemi (37 %). 21 % vykazovaly pouze renální malformace. U 50 % pacientek se objevily zdravotní komplikace jako infekce močového traktu, proteinurie a arteriální hypertenze, ale k progresi chronického selhání ledvin nedošlo.<sup>33</sup>

Co se týče léčby, růstový hormon může pomoci dětem trpícím Turnerovým syndromem dosáhnout vyššího vzrůstu. Léčba také často začíná náhradní terapií estrogenem, když jsou dívky přibližně ve věku 12 nebo 13 let. Tato terapie napomáhá růstu prsou,



ochlupení a dalším sexuálními charakteristikám. Ženy, které si přejí otěhotnět, mohou zvážit použití darovaného vajíčka.<sup>34</sup>

#### **2.4.1.3. Kompletní a nekompletní forma XX a XY gonadální dysgeneze**

Tuto skupinu onemocnění tvoří pacienti s normálním počtem chromozomů, ale přítomný chromozom Y není úplný. Gonadální dysgeneze tohoto typu mohou být buď čisté (pure gonadal dysgenesis) nebo smíšené (mixed gonadal dysgenesis) s přítomností chromozomu Y.<sup>2</sup>

#### **Čistá gonadální dysgeneze (PGD)**

Podobně jako u Turnerova syndromu vznikají lištovité gonády i u čisté gonadální dysgeneze s karyotypem 46,XY. Při normálním vývoji dochází k přeměně podpůrných buněk v Sertoliho buňky, které mají významnou úlohu v dalším rozvoji varlete. Indukují vývoj zárodečných a Leydigových buněk, produkují antimüllerský hormon (AMH).<sup>35-37</sup> Pokud nejsou genetické signály, vyvíjí se nediferencovaná tkáň nedostatečně a chybí i její sekreční aktivita. U dívek je situace podobná, kdy z mezenchymálních buněk vznikají buňky thekální a vytváří se folikul obklopující oocyt.

Fenotyp pacientek s touto dysgenézí je ženský, karyotyp u vyšetřovaných žen bývá 46,XY. Asi u 10 – 15 % pacientů je příčinou kompletní čisté gonadální dysgeneze mutace či delece v genu SRY. Často se také na tomto onemocnění podílí změny v chromozomu X.<sup>38</sup>

Pacientky narozené s XY ženským typem gonadální dysgeneze (Swyerův syndrom) se jeví jako normální „ženy“, nicméně v pubertě se jim nevyvinou sekundární pohlavní znaky, nemenstruují a mají vazivovou lištu. Tyto pacientky jsou proto často považovány za dívky s Turnerovým syndromem, protože většinou přicházejí na vyšetření v období puberty právě kvůli nevyvinutí sekundárních pohlavních znaků. K odlišení čisté gonadální dysgeneze od TS vede genetické vyšetření, při kterém se zjišťuje v karyotypu chromozom Y.<sup>39</sup>

Na rozdíl od TS zde nenacházíme tak častá degenerativní stigmata, nebývá patrné postižení dalších systémů. Pacientky mají často afunkční testikulární tkáň, chybí sekreční aktivity Sertoliho buněk (tedy již uváděný AMH), díky tomu nedochází k potlačování Müllerových vývodů, které se dále vyvíjejí na vejcovody, dělohu a horní část vaginy. V Leydigových buňkách není přítomna sekrece, chybí testosteron a dihydrotestosteron (DHT), zevní genitál není virilizován a vývoj tak pokračuje dále ve svém bazálním ženském vývoji. Během puberty pak chybí mužské i ženské pohlavní hormony a nedochází tak

k vývoji sekundárních pohlavních znaků. V tomto období se také zvyšují hladiny gonadotropinů FSH a LH. Můžeme se setkat i s gynekomastií.<sup>37,40,41</sup>

Léčba tohoto onemocnění je založena na podávání růstového hormonu, doplnění estrogenu a v pozdějším věku kompletní substituční léčbou ženskými pohlavními hormony. Tato substituce je zásadní pro další rozvoj vnitřního pohlavního ústrojí, především dělohy. Při vhodné substituci a darovanému vajíčku je možné i mateřství.<sup>42</sup>

### **Smíšená gonadální dysgeneze**

U pacientek se smíšenou gonadální dysgenezí s přítomností chromozomu Y je situace složitější, mají karyotyp 45 X/46 XY.

Oproti čisté gonadální dysgenezi nemají pacientky vnitřní ženský genitál a zevní genitál je malformovaný, někdy označovaný jako neúplná virilizace mužského zevního pohlavního ústrojí či maskulinizace ženského zevního pohlavního ústrojí. Vnitřní genitál je také obojetný, stejně tak vývoj gonád, který není dokončen díky poruše diferenciaci jednotlivých buněk, a to hlavně v oblasti testes. Kvůli výrazné dysgenezi ovaria na jedné straně vzniká lištovitá, pruhovitá gonáda. Pokud jsou v této ovariální tkáni nalezeny primordiální folikuly, jedná se o pravý hermafroditismus. Na straně druhé se vyskytuje dysgenetická testikulární tkáň. U těchto pacientů dochází k neúplné virilizaci v dětství, neboť dysgenetické varle může mít určitou i když nedostatečnou sekreční hormonální aktivitu a periferní metabolismus testosteronu je zachován.<sup>43,44</sup>

Obvyklým nálezem u pacientů s tímto onemocněním bývá hypertrofie klitoridy, někdy až nevyvinutý penis, často s hypospadickým vyústěním uretry. Varle je buď uloženo v inguinálním kanále nebo v dutině břišní, nebo může být sestouplé do skrota.<sup>45</sup>

Dysgenetické varle produkuje určité množství AMH, tím tak dochází k potlačení dalšího vývoje Müllerových vývodů. Tato sekrece není dostatečná, a proto se na straně lištovité gonády vyvíjí z Müllerových vývodů vejcovod, děloha a horní třetina vaginy. V prepubertě a pubertě je typickým znakem zvýšení hladiny gonadotropinů.

Pro diagnózu u dětí je důležité vyšetření karyotypu a zjištění mozaiky s chromozomem Y. U těchto pacientů opět bývá dobrá odezva na léčbu růstovým faktorem.<sup>2</sup>

#### **2.4.1.4. Pravý hermafroditismus**

První vědecké zkoumání pravého hermafroditismu je připisováno *Klebsovi E.*<sup>46</sup> Na počátku moderní cytogenetické éry, asi v roce 1958, bylo zdokumentováno přibližně 200

pravých hermafroditů. Analýzy těchto dřívějších případů vedly k určitému klinickému zevšeobecnění, která mají však platnost dodnes. Podle lokalizace gonád můžeme rozlišit tři typy pravého hermafroditismu:

- a) laterální hermafroditismus (20 % jedinců), kdy na jedné straně je uloženo varle a na druhé straně ovarium, obvykle vlevo,
- b) unilaterální hermafroditismus (50 % jedinců), kdy na jedné straně je ovotestis, resp. testis a ovarium, na druhé straně buď ovarium, nebo méně často varle. Vlevo bývá častěji jednoznačně diferencovaná gonáda,
- c) bilaterální hermafroditismus (30 % jedinců) s ovotestis nebo oběma gonádami na obou stranách.

V případě nalezení obou diferencovaných tkání v jednom útvaru ho nazýváme ovotestis. Ovaria a testikulární části ovotestis byly obvykle napojeny konci k sobě, což umožňovalo diagnózu na základě pohmatu. Děloha byla obvykle přítomna. Vejcovod byl obvykle přítomen ipsilaterálně k vaječníku a také často ipsilaterálně k ovotestis. Pokud bylo přítomno varle, chánovod a epididymis byly obvykle přítomny ipsilaterálně k testis. V pubertě obvykle došlo k vývoji prsou a vyskytla se menstruace.<sup>47</sup>

Histologický průkaz ovotestis je podkladem diagnózy pravého hermafroditismu.<sup>4</sup>

V roce 1959 *Harnden a Armstrong*<sup>48</sup> a dále *Hungerford et al.*<sup>49</sup> popsali první případy pravého hermafrodita podrobeného cytogenetické analýze. Obě skupiny překvapivě oznámily karyotyp 46,XX.

Roku 1977 byla provedena cytogenetická studie na 240 živě narozených dětech, které splnily tradiční histologická kritéria pro onemocnění hermafroditismem.<sup>50</sup>

Pravý hermafroditismus je patogeneticky podmíněn přítomností genu kódujícího H-Y antigen v některých buňkách a dvou chromozomů X v jiných buňkách. Nejčastějším karyotypem je u tohoto onemocnění 46,XX. Při tomto karyotypu je gen kódující H-Y antigen translokován na chromozom X z otcovského původu do té jeho části, jež v diploidních jádrech podléhá heteropyknotické inaktivaci. Vývoj testikulární tkáně podmiňují buňky obsahující H-Y antigen. Naopak podmínkou vývoje ovariálních folikulů jsou buňky se dvěma

chromozomy X, které antigen H-Y neobsahují. Případů pravých hermafroditů 46,XX, kteří jsou SRY pozitivní, je pouze 10 %.<sup>51</sup>

Vzhledem k heterogenitě fenotypových nálezů je diagnostika velmi obtížná:<sup>2</sup>

#### ➤ **46,XX/46,XY**

Pravý hermafroditismus typu 46,XX/46,XY je vzácnější než karyotyp 46,XX, ale je stejně běžný jako karyotyp 46,XY. Ne všichni jedinci s karyotypem 46,XX/46,XY jsou praví hermafroditi, někteří jsou fenotypově normální nebo mají gonádovou dysgenezi či mužský pseudohermafroditismus.<sup>52</sup>

U osob trpících tímto typem pravého hermafroditismu jsou vždy přítomny semenotvorné kanálky i vaječnickové folikuly. Testikulární tkáň, ať už existující jako oddělené varle nebo jako jedna ze složek ovotestis, se vyznačuje relativně malým množstvím normálních zárodečných buněk. Tubuly jsou obvykle hyalinizované a složené pouze ze Sertoliho buněk, Leydigovy buňky mohou být hyperplastické. Naproti tomu, ovariální tkáň často obsahuje četné primordiální folikuly v různých vývojových stádiích. O tom, že je ovariální tkáň často normální svědčí také vývoj prsou, menstruace a histologické známky ovulace.<sup>43</sup> Tito praví hermafroditi obvykle mají Müllerovy vývody, jmenovitě pak dělohu a jeden nebo více vejcovodů. Zřídka chybí děloha.<sup>50</sup>

#### ➤ **45,X/46,XY**

Jedinci s tímto karyotypem se liší spektrem fenotypů, od téměř normálních mužů až k ženám, které jsou k nerozeznání od žen s karyotypem 45,X u gonadální dysgeneze.<sup>53</sup> Různé fenotypy pravděpodobně reflektují na distribuci buněk v tkáni u karyotypů 45,X a 46,XY. Tento předpoklad však nebyl ověřený, a ve skutečnosti často ani nemůže být prokázán.

#### ➤ **46,XY**

Podle *Simpsona J. L.*, bylo hlášeno kolem 40 případů 46,XY pravého hermafroditismu, ačkoliv kompletní popis u všech z nich nebyl možný. Více než polovina pacientů byli Japonci, proto se tento typ karyotypu pravého hermafroditismu ukázal jako jeden z nejčastějších typů hermafroditismu v Japonsku, mimo Asii je však tento typ velmi vzácný.<sup>47</sup>

### ➤ 46,XX

Praví hermafroditi s karyotypem 46,XX mají oproti jiným typům pravých hermafroditů mnohem častěji buď levý vaječník a pravé ovotestis, nebo bilaterální ovotestis. Zejména unilaterální hermafroditismus je méně častý než u 46,XY pravých hermafroditů. Také je méně pravděpodobné, že bude přítomna děloha. Rozložení gonád bývá nejčastěji tak, že vlevo je ovárium a na pravé straně ovotestis. Druhým nejběžnějším rozložením je bilaterální ovotestis.<sup>54</sup>

V 80 % případů je přítomna děloha. A jako u ostatních typů pravých hermafroditů, je i zde obvykle přítomný chámovod a epididymis ipsilaterálně k testis a vejcovod ipsilaterálně k ovotestis. Nicméně občas jsou přítomny pouze Wolffovy vývody nebo oboje Müllerovy a Wolffovy vývody společně.<sup>47</sup>

### ➤ 46,XX/47,XXY

Na třinácti případech hermafroditů s karyotypem 46,XX/47,XXY zjištěných až do roku 1977, byly nejvíce studovány kultury lymfocytů. V deseti případech bylo pohlaví vybráno ošetřujícím lékařem. V 8 z 10 případů byla přítomna děloha.<sup>47</sup>

## 2.4.2. Ženský pseudohermafroditismus

Nadměrné hladiny androgenů u žen mohou ovlivňovat primární pohlavní znaky maskulinizací vnějších fetálních pohlavních orgánů. Ženský pseudohermafroditismus je stav, kdy gonády jsou ženské, ale vnější pohlavní orgány jsou maskulinizovány. Karyotyp těchto pacientů je 46,XX. Ženské pohlavní orgány se mohou vyskytnout velmi nejednoznačně, pokud je přítomno nadměrné množství androgenů během fetálního období vývoje. Stupeň maskulinizace poté záleží na délce expozice těmto androgenům. Pokud je jim plod vystaven po 12. týdnu, kdy jsou pochva a močová trubice separovány, objeví se pouze hypertrofie klitorisu. Pokud jsou hladiny androgenů vysoké před tímto stářím plodu, dojde k obliteraci urogenitálního sinu.

Virilizace u žen je stav charakterizovaný některou z následujících poruch: předčasný vznik ochlupení ve stydké oblasti, hirsutismus, akné, mužská plešatost nebo nepravidelné menstruace. To ale vyžaduje postnatální expozice androgenu. U pacientek s maskulinizací se často rozvíjí i virilizace, ale ne všechny pacientky se syndromem virilizace byly maskulinizovány, snad s výjimkou různých stupňů postnatální hypertrofie klitorisu.

Vysoké hladiny androgenů jsou nejčastěji způsobeny hyperplazií nadledvin v důsledku genetické vady steroidů, jako výsledek genetického defektu syntézy steroidních hormonů, nazývané „kongenitální adrenální hyperplazie (CAHs)“.<sup>55</sup>

U fetu je zásadní vývoj ženského zevního genitálu. Jakékoliv maskulinizace, normální nebo patologické, jsou výsledkem působení androgenů. Adrenokortikální diferenciaci buněk se objevuje v časně embryogenezi a je aktivní po zbytek těhotenství a vrcholí po narození. V období od 8. do 13. týdne dochází u fetu v přítomnosti syntézy steroidů aktivní kůrou nadledvin k pohlavní diferenciaci. Nadměrná produkce androgenů během tohoto kritického období způsobí maskulinizaci vnějšího genitálu. Rozsah maskulinizace se pohybuje v rozmezí od mírně zvětšeného klitorisu přes různé stupně fúze labioskrotálních valů až k vážným morfologickým anomáliím, jako je penilní uretra.

Mužská diferenciaci vnitřního genitálu probíhá pod kontrolou dvou hormonálních faktorů produkovaných v efektivním množství pouze fetálními varlaty. Za prvé je to testosteron, který řídí formaci mužských genitálních struktur z Wolffových, mezonefrických, ductů.<sup>56</sup> Za druhé antimüllerovský hormon, glykoprotein, který potlačuje rozvoj müllerových kanálů do vnitřních ženských struktur.<sup>57</sup>

Genetické pohlaví a diferenciaci gonád bývají normální u pacientů s CAH. Důvodem je, že tito pacienti nemají žádnou anomální sekreci antimüllerovského hormonu. Vejcovody, děloha a horní část pochvy se vyvíjí normálně.<sup>58</sup>

Ženský pseudohermafroditismus nebo virilizaci mohou způsobit následující enzymové defekty ve steroidogenezi:<sup>59-61</sup>

1.  $3\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenáza deficit
2. 21-Hydroxyláza deficit
3.  $11\beta$ -Hydroxyláza

Co se týče léčby, tak zásadní úlohu v endokrinologické terapii CAH hraje doplnění nedostatku hormonů. Od roku 1950, kdy *Wilkins*<sup>62</sup> a *Bartter*<sup>63</sup> objevili účinnost léčby kortikoidy u onemocnění CAH z nedostatku enzymu 21-hydroxylázy, je použití glukokortikoidů základním kamenem terapie tohoto onemocnění.

#### 2.4.3. Mužský pseudohermafroditismus

U mužského pseudohermafroditismu nemají jedinci s chromozomem Y tak dostatečný vývoj zevních pohlavních orgánů, jako se předpokládá u zdravých mužů. Případy mužského pseudohermafroditismu zahrnují cytogenetické abnormality, teratogenní příčiny, defekty

v syntéze testosteronu a defekty v působení androgenů. Diagnostika a léčba tohoto onemocnění je dnes běžná a dobře stanovená.<sup>64,65</sup>

Mužský pseudohermafroditismus zahrnuje široké spektrum příčin:<sup>66</sup>

- antiestrogeny
- cytogenetické abnormality
  - 45,X/46,XY
  - 45,X/47,XXY a 45,X/46,XY/47,XYY mozaika
- smíšená gonadální dysgeneze
  - autosomální abnormality
  - defekty v testikulární aktivitě
- ageneze gonád
  - ageneze Leydigových buněk nebo hypoplazie
  - defekty v syntéze androgenů
- deficit komplexu cholesterol-desmoláza
  - deficit 3 $\beta$ -hydroxylázy (3 $\beta$ HSD)
  - deficit 7 $\alpha$ -hydroxylázy (CYP17)
  - deficit 17,20 – desmolázy
  - deficit 17-hydroxysteroid dehydrogenázy (17HSD)
- defekty cílových buněk pro androgeny
  - kompletní androgenní necitlivost (ARG)
  - částečná androgenní necitlivost (ARG)
  - deficit 5 $\alpha$ -reduktázy

Jako mužský pseudohermafroditismus se označuje stav, který je charakterizovaný přítomností jednoho nebo obou varlat a

- a) zevním genitálem ženským nebo obojetným,
- b) přítomností dělohy bez ohledu na to, jakého charakteru je zevní genitál,
- c) androgen rezistencí a jí podmíněným ženským vývojem prsů a hypospadií.

Fenotyp je pak výsledkem nedostatečné citlivosti periferních tkání na androgeny nebo je výsledkem poruchy některého z enzymů biosyntézy androgenů či důsledkem poruchy vývoje varlat, která se projevuje ve fetálním období nedostatečnou sekrecí faktoru působícího

regresi Müllеровých vývodů. Bývají často přítomna hypoplastická varlata a jejich sestup není ukončen, mohou být ale vyvinuta i normálně.

Fenotypická klasifikace mužského pseudohermafroditismu:

<b>1. Androgen – rezistentní mužský pseudohermafroditismus</b>	
a) úplná testikulární feminizace	
b) neúplná testikulární feminizace	
c) hypospadická forma testikulární feminizace	
<b>2. Androgen - senzitivní mužský pseudohermafroditismus</b>	
a) bez dělohy	I. eunuchoidní, zpravidla hypogonadotropní forma
	II. virilizovaná, normo- nebo hypogonadotropní forma
	III. feminizovaná forma
b) s dělohou	I. s ženským nebo obojetným genitálem
	II. s mužským genitálem, někdy hypospadickým

Tab. č. 2: Fenotypická klasifikace mužského pseudohermafroditismu.

Jsou známy dva typy perzistence Müllеровých vývodů, unilaterální a bilaterální. Jednostranná, unilaterální, perzistence vzniká vývojovým poškozením jednoho varlete. Oproti tomu bilaterální jsou vždy spojeny s těžkým vývojovým poškozením obou varlat a vždy je doprovází malformace zevního genitálu. Řadíme je do skupiny mužského pseudohermafroditismu s dělohou. Karyotyp je zde 46,XY a co se týče hormonálních hladin, obvykle se neliší od normálních mužů.<sup>51,57</sup>

## 2.5. Kryptorchismus

### 2.5.1. Etiologie

Mužské pohlavní žlázy se vyvíjejí vysoko v bederní krajině (L1-L2) při zadní stěně břišní. Těsně před narozením je ukončen jejich vývoj, ale růstový posun může být ukončen až



po narození. Sestup varlat (*descensus testium*) je velmi důležitý pro jejich budoucí funkce a je jedním ze znaků donošeného dítěte.

Na sestupu varlat se podílí tzv. *gubernaculum testis*. Tento vazivový pruh spojuje dolní pól varlete se stěnou vyklenujícího se šourku (*scrotum*). Obsahuje také hladké svalové buňky, které mají na svém povrchu receptory pro testosteron. Pomocným mechanismem sestupu varlat je zřejmě kontrakce *gubernaculum testis* v závěrečné fázi sestupu. Ve třetí čtvrtině nitroděložního života je průchodem varlete tříselným kanálem sestup dovršen. V případě, že není úplný, varle je zadrženo (*retentio testis*, kryptorchismus), nejčastěji v průběhu *canalis inguinalis* nebo v jeho abdominálním konci.<sup>3</sup>

Kryptorchismus je běžná anomálie genitálu diagnostikovaná při narození nebo v průběhu dětství. Genetické nebo environmentální faktory, které mění expresi nebo funkci hormonů rozhodující pro sestup varlat, podobně jako inzulin a testosteron, mohou přispět ke vzniku kryptorchismu.<sup>68</sup>

Může se jednat o poruchu unilaterální (jedno varle), nebo bilaterální (obě varlata). Dále můžeme rozlišit dle polohy nesestoupeného varlete na abdominální, inguinální a ektopické varle.

Sestup varlat není dokončen asi u 2,7 % chlapců, u nedonošených u 21 %. Během prvního měsíce života se ale u poloviny těchto chlapců sestup dokončí, a tak na konci prvního roku života zůstává asi 0,8 % chlapců s jedním či dvěma varlaty v tříselném kanálu nebo v dutině břišní. Pokud nedojde včas k nápravě, je ohrožena spermiogeneze.

Příčina kryptorchismu není přesně známá. Doporučuje se ale všem mužům, u kterých byl kryptorchismus v dětství diagnostikován, aby byli celoživotně sledováni, neboť u nich hrozí zvýšené riziko nádoru. Toto riziko není sníženo ani chirurgickou korekcí kryptorchismu. U nitrobřišně zadržovaných varlat je nejvyšší stupeň maligních nádorů.<sup>68-70</sup>

V terapii kryptorchismu se nám nabízí tři možnosti: hormonální, chirurgická, nebo jejich kombinace. Úspěšnost léčby závisí na pozici varlete v době jeho diagnostiky. Používání lidského choriového gonadotropinu (hCG) stimuluje Leydigovy buňky k produkci testosteronu. Gonadotropin - uvolňující hormon (GnRH) stimuluje hypofýzu k sekreci LH, který okamžitě stimuluje Leydigovy buňky k produkci testosteronu, čím se zahájí sestup. Orchidopexie je standardní chirurgický zákrok, při kterém dojde k svedení varlat do skrota.<sup>71</sup>

Pokud je identifikován při narození, chirurgická léčba je indikována až ve věku 6 měsíců a to v případě, že varle nesestoupí. U starších dětí se tato porucha řeší chirurgicky v okamžiku, kdy je diagnostikována. Pro břišní varlata se upřednostňuje laparoskopický přístup. Časná chirurgická léčba může snížit riziko subfertility nebo zhoubného nádoru.<sup>68</sup>

### 2.5.2. Dysgenetické varle

Dysgenetické neboli ektopické varle se nachází mimo svou obvyklou dráhu sestupu, nejčastěji v peritoneu. K ektopii varlete dochází pravděpodobně vlivem anomálie gubernaculum testis.<sup>69</sup>

### 2.5.3. Nesestoupené varle

V případě nesestoupených varlat můžeme rozlišit čtyři situace. První z nich je intraabdominální varle, které se obvykle nachází před vchodem do inguinálního kanálu. Tato situace se týká asi 10 % případů. Druhým případem je varle v inguinálním kanálu, které eventuálně může dočasně sestoupit do horní části skrota. Týká se asi 20 % případů. Velmi početnou skupinu případů tvoří varle v horní části skrota, a to 40 %. Poslední situací je zadržené varle, jehož sestupu brání mechanická překážka z fascie mezi inguinální výchlípkou a vstupem do skrota. Tato porucha se vyskytuje asi 30 % případů.<sup>51</sup>

### **3. MATERIÁL A METODY**

### **3.1. Materiál určený k analýze**

Pro potřeby naší práce jsme použili bioptického materiálu od pacientů mužského pohlaví s poruchami vývoje gonád ve věku 2 až 12 let, který byl získán z archivního materiálu Laboratoře poruch rané ontogeneze Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze – Podolí a z Dětské kliniky FN v Hradci Králové. Biopsie jsme zpracovali jednak metodami světelné mikroskopie, jednak technikou používanou pro účely elektronové mikroskopie – zhotovení polosilných řezů.

### **3.2. Světelná mikroskopie**

#### **3.2.1. Zpracování tkáně pro světelnou mikroskopii**

1. FIXACE
2. ODVODNĚNÍ
3. PROJASNĚNÍ
4. PROSYCENÍ A ZALITÍ DO PARAFINU
5. KRÁJENÍ A LEPENÍ NA PODLOŽNÍ SKLÍČKA
6. BARVENÍ
7. ZAMONTOVÁNÍ
8. HODNOCENÍ

#### **3.2.2. Fixace**

Fixace je rychlé vysrážení (denaturace) bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky. Účelem této fixace je zabránit samovolnému rozkladu tkáně (autolýze) působením enzymů. Autolýza vede ke změnám protoplazmy a až k úplnému rozkladu buněk a tkání. Fixace musí být schopna zachovat původní strukturu tkáně, její barvitelnost a musí rychle do dané tkáně pronikat. Po odebrání tkáně je nutné ji co nejrychleji vložit do fixační tekutiny. Naše tkáně byly fixovány v Bouinově roztoku a ve formalínu.

### 3.2.3. Odvodnění, projasnění, prosycení a zalití do parafinu

Odvodnění se provádí proto, že zalévací média nejsou mísitelná s vodou, proto je nutné vodu z tkání odstranit tzv. vzestupnou řadou alkoholů nebo acetonem. Projasnění tkáně docílíme odstraněním ethanolu rozpouštědlem, ve kterém je rozpuštěný parafin (nejčastěji xylén, benzen nebo toluen). Následuje prosycení parafinem, přičemž teplota parafinu nesmí překročit 58 °C. Dále se provede vlastní zalití vzorků do zkvalitněného parafinu za vzniku tkáňových bloků.

#### Postup:

##### **Fixace v Bouinově roztoku:**

Bouinův roztok	3 dny
80% ethanol	1 hodina
aceton	3 krát během 24 hodin
xylén	2 krát během 10 minut
parafin	2 krát během 24 hodin
zalití do parafinu.	

#### Složení roztoků:

##### **Bouinův roztok:**

nasycený roztok kys. pikrové	300 ml
neutrální formol	100 ml

Před použitím se přidají 3 ml ledové kyseliny octové na 100 ml roztoku.

##### **Formol neutrální**

10% formol (obsahuje 4 % formaldehydu)

Na dno nádoby se nasype 2 cm vysoká vrstva práškového uhličitanu vápenatého, který neutralizuje vznikající kyselinu mravenčí.

##### **Parafin**

Tuhý parafin zkvalitněný 3 - 5% bílého včelího vosku.

#### Fixace ve 4% formalínu:

Formalín	48 h
70% ethanol	½ hodiny

70% ethanol	½ hodiny
80% ethanol	3 hodiny
90% ethanol	2 hodiny
96% ethanol	přes noc
aceton	½ hodiny
aceton	½ hodiny
xylén	2 hodiny
xylén	4 hodiny
parafin	přes noc
parafin	přes noc
zalití do parafinu.	

#### 3.2.4. Krájení a lepení na podložní sklíčka

Parafinové bločky se krájí na sáňkovém mikrotomu Leitz – Wetzlar na řezy tenké 5 µm. Nakrájené řezy se pomocí preparačních jehel přenesou na podložní sklíčko a přilepí pomocí směsi glycerinu s bílkem.

#### 3.2.5. Barvení

##### 3.2.5.1. Barvení Hematoxylin – eozin

###### **odparafinování:**

xylén	3 krát 5 minut
96% ethanol	5 minut
70% ethanol	5 minut
destilovaná voda	5 minut
Otření sklíček buničinou.	

###### **barvení:**

hematoxylin	6 – 8 minut
pramenitá voda	10 minut
Otření sklíček buničinou a kontrola zmodrání jader pod mikroskopem.	

eosin	2 minuty
destilovaná voda	opláchnutí

**odvodnění:**

96% ethanol	2 krát, poté opláchnutí
ethanol : xylen (2 : 1)	3 minuty
ethanol : xylen (1 : 2)	3 minuty

**projasnění:**

xylen	3 krát 3 minuty
Otření sklíček buničinou.	

Roztoky:

**Hematoxylin Hill:**

hematoxylin	4,0 g
jodičnan sodný	0,4 g
síran hlinitý	35,2 g
destilovaná voda	710,0 ml
ethylenglykol	250,0 ml
kys. octová	40,0 ml

**Roztok eosinu:**

1% Roztok eosinu v destilované vodě.

Výsledek barvení:

Jádra buněk a chrupavka se barví modře, kolagenní vazivo růžově a svalstvo červeně.

### 3.2.5.2. Barvení zelený trichrom (ZT)

#### **odparafinování:**

xylén	3 krát 5 minut
96% ethanol	5 minut
70% ethanol	5 minut
destilovaná voda	5 minut
Otření sklíček buničinou.	

#### **barvení zelený trichrom:**

destilovaná voda	opláchnutí
hematoxylin	3 -5 minut
70% alkohol	opláchnutí
Diferencovat v kyselém alkoholu.	

pramenitá voda	opláchnutí
Kontrola v mikroskopu.	

Goldner I.	10 minut
destilovaná voda	opláchnutí
Goldner II.	10 minut
destilovaná voda	opláchnutí
Goldner III.	10 minut
destilovaná voda	opláchnutí

#### **odvodnění:**

96% ethanol	2 krát, poté opláchnutí
ethanol : xylén (2 : 1)	3 minuty
ethanol : xylén (1 : 2)	3 minuty

#### **projasnění:**

xylén	3 krát 3 minuty
Otření sklíček buničinou.	



### Roztoky:

#### **Goldner I.:**

A)

ponceau de xylidin	1 g
koncentrovaná kys. octová	1 ml
destilovaná voda	100 ml

B)

oranž G	1 g
koncentrovaná kys. octová	1 ml
destilovaná voda	100 ml

C)

Fuchsin S	1 g
koncentrovaná kys. octová	1 ml
destilovaná voda	100 ml

Goldner I. se připraví smícháním 20 ml roztoku A, 10 ml roztoku B a 10 ml roztoku C.

#### **Goldner II.:**

1 % vodného roztoku kys. fosfowolframové.

#### **Goldner III.:**

světlá zeleň	1,5 g
ledová kys. octová	2 ml
destilovaná voda	100 ml

### Výsledek barvení:

Jádra buněk jsou obarvena modře, svalovina cihlově červeně, kolagenní vazivo zeleně, erytrocyty oranžově a hyalinní vazivo červeně.

### 3.2.6. Zamontování

U obou barvení, hematoxylin - eozin i zelený trichrom, se zamontování provádí do kanadského balzámu.

### 3.2.7. Hodnocení

Histologické hodnocení preparátů jsme prováděli pomocí mikroskopu Nikon Eclipse E200, mikroskopu Hund Wetzlar V300, digitální kamery PixeLINK PL-A642, Vitana Corp. a programu LUCIA ver. 5.0, Laboratory Imaging Praha.

## 3.3. Elektronová mikroskopie

### 3.3.1. Zpracování tkáně pro zhotovení polosilných řezů

#### **1. den**

Odběr a přikrojení živé tkáně a její fixace v 3% roztoku glutaraldehydu ve fosfátovém pufru. Fixace do dalšího dne v lednici.

#### **2. den**

Proplach vzorků puftrem 4 krát po 15 minutách, uchováváme v lednici.

Druhá fixace vzorků: 2% roztokem kyseliny osmičelé ve fosfátovém pufru 2 až 3 hodiny. Vzorky stále uchováváme v lednici.

Proplach vzorků puftrem 4 krát 15 minut. Vzorky se uchovávají v lednici před dalším zpracováním (i několik dní), nebo se hned zpracovávají dále.

#### Odvodňování vzorků alkoholovou řadou:

25% ethanol čistý, vychlazený	15 minut v lednici
50% ethanol čistý, vychlazený	15 minut v lednici
75% ethanol s 1% uranylacetátu, vychlazený	15 minut v lednici
96% ethanol s 1% uranylacetátu, laboratorní teplota	15 minut
100% ethanol s 1% uranylacetátu, lab. teplota	15 minut
100% ethanol, laboratorní teplota	2 x 15 minut

### Prosycování vzorků směsmi:

1. směsí: 100% aceton : epoxidová pryskyřice = 2 : 1, 1 hodinu v boxu na míchačce
2. směsí: 100% aceton : epoxidová pryskyřice = 1 : 2, 1 hodinu v boxu na míchačce
3. koncentrovanou epoxidovou pryskyřicí = směs Epon + Durkupan do dalšího dne v boxu při vlhkosti vzduchu do 40 %

Epoxidové pryskyřice jsou silně hydrofobické, proto se s nimi pracuje pouze ve vysušeném boxu s vlhkostí vzduchu do 40 %.

### **3. den**

Zalít vzorků do tobolek nebo formiček a to do epoxidové pryskyřice Epon + Durkupan a zhotovené bločky dány polymerovat při 60 °C do termostatu na 72 hodin. Po polymeraci jsou bločky zcela tvrdé.

### Příprava fixačních roztoků:

#### **a) Millonigova tekutina (fosfátový pufr)**

roztok A: dihydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ..... 22,6 g/l l povařené destilované vody o pH = 6,47

roztok B: hydroxid sodný (NaOH) ..... 12,6 g/500 ml povařené destilované vody

roztok C: glukóza ..... 5,4 g /100 ml redestilované vody o pH = 6,05

roztok D (Uchovávací pufr): roztok A o objemu 415 ml + roztok B o objemu 85 ml se po úpravě na pH = 7,2 – 7,3 uchovává v lednici

roztok E (pufr s glukózou): roztok D o objemu 90 ml + roztok C o objemu 10 ml, vždy se připravuje čerstvý a pH se upraví na 7,2 – 7,3

#### **b) 3% roztok Glutaraldehydu v pufru - příprava z 8% roztoku Glutaraldehydu (GA)**

### Příprava zásobních roztoků:

1.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  ..... 0,20 mol/l    7,16/100 ml redest.vody, skladovat při 5 °C
2.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 0,20 mol/l    2,72/100 ml redest.vody, skladovat při 5 °C
3. vodný roztok GA 6% .. 0,59 mol/l    ampule s 8% roztokem GA 10 ml se zředí 3,7 ml redest.vody

### Příprava fosforečnanového tlumivého roztoku:

zásobní roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  ..... 80 ml

zásobní roztok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 20 ml

Změříme pH a nastavíme hodnotu na 6,7 – 7,1, je-li hodnota vyšší, přikapává se roztok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a opět se měří hodnota pH. Pokud je hodnota nižší, přikapává se roztok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a opět se změní hodnota pH. Postup se opakuje do doby, dokud není pH hodnota v požadované mezi.

### Příprava fixačního roztoku – 3% GA v pufru v poměru 1:1

Millonigův pufr o pH = 6,9 – 7,1 ..... 13,7 ml

6% roztok GA (0,59 mol/l) ..... 13,7 ml

Hodnotu pH lze nastavovat i u fixačního roztoku, proto se opět přeměří pH.

Roztok obsahuje 299 mmol/l ..... 3% GA ..... celková osmolalita je 590 Osm/kg. Roztok nelze skladovat, ale vždy je nutné připravit jej čerstvý.

### **c) 2% roztok kyseliny osmičelé v pufru**

Příprava 5 ml roztoku:

Millonigův pufr ..... 1,5 ml

redestilovaná voda..... 1,0 ml

4% roztok kys. osmičelé ..... 0,025 ml

Roztok se uchovává v lednici při teplotě 5 °C.

### 3.3.2. Zhotovení polosilných řezů

1. Tvorba pyramidy na bločku upevněném do hlavice acetonem odmaštěnou žiletkou se zkrajuje pod úhlem 45°. Vrchní ploška pryskyřice z vrcholu bločku se zkrojí do tvaru pyramidy až k tkáni. Vytvoří se tak malá pyramida na velké pyramidě, aby řezná plocha byla menší a vzniklý čtvereček na krájení těsně obklopoval tkáň.
2. Upevnění bločku s hlavicí na hlavu ultramikrotomu a zkrajování řezné plošky skleněným nožem na sucho do roviny.
3. Výměna nože s vaničkou, do vaničky se napustí redestilovaná voda injekční stříkačkou, aby se vytvořila hladinka přesná s hranou nože. Musí se od ní odrážet světlo. Do vody se přidává 96% alkohol (na 50 ml vody se přidají 2 ml alkoholu).
4. Krájení materiálu na řezy silné 200 - 350 nm. Řezy by měly na hladince tvořit řetěz a být barevné (duhové) bez vrubů, aby byla vidět struktura tkáně.
5. Sběr řezů z hladinky a jejich následné barvení.

### 3.3.3. Barvení polosilných řezů

1. Na acetonem odmaštěné podložní sklo se nanese kapka redestilované vody, na kterou se preparační jehlou přenesou z vaničky nože polosilné (do 2  $\mu$ m) řezy.
2. Nad kahanem se nechá odpařit voda, řezy se tak napnou a přischnou.
3. Řezy se zakápnou barvicím roztokem a žíhají se nad plamenem asi 10 sekund.
4. Slijí se a opláchnou se redestilovanou vodou.
5. Na řezy se nakape 50% alkohol a nechají se diferencovat.
6. Opět slití a opláchnutí řezů redestilovanou vodou.
7. Sklíčko se vysuší nad plamenem a řezy se prohlédnou pod světelným mikroskopem.
8. Zamontování do Entalánu.

### 3.3.4. Montování řezů

Řezy se montují na sklíčku do Entalánu kápnutím malé kapky montovací látky na řezy a přiklopením krycího sklíčka odmaštěného acetonem.

## **4. VÝSLEDKY**

## 4.1. Histologické hodnocení preparátů

Jelikož jsme měli k dispozici 3 typy barvení (HE, ZT a barvení polosilných řezů), lze celý histopatologický proces detailněji sledovat z hlediska různých cytologických komponent. Fotodokumentace preparátů je zařazena v obrazkové příloze.

### 4.1.1. Hodnocení preparátů Klinefelterova syndromu

Na obrázku č. 1 a 2 můžeme pozorovat varle u prepubertálního Klinefelterova syndromu. Na detailnějším řezu (obr. č. 2) jsme pozorovali rozdílnost průměru kanálků, které měly zachovalou populaci zárodečných buněk. Společným znakem těchto typů kanálků bylo výrazné zesílení bazální membrány a zmnožení peritubulárních komponent. V těchto kanálcích se nacházely téměř výhradně Sertoliho buňky. Ty tvořily v kanálcích o širším průměru hustou prostorovou síť, která se lišila svou denzitou. Některé typy byly výrazně tmavší, eozinofilnější, oproti světlejším typům, které je doplňovaly. Velikostí a tvarem se tyto elementy nijak neodlišovaly. V obou typech byla dobře rozlišitelná jádérka. V kanálcích menších typů tvořily výstelku obdobné komponenty, které se lépe rozlišovaly vyšší denzitou tmavších typů. Shluky denzních Sertoliho buněk kondenzací chromatinu připomínaly degenerující typ buněk. Byly lokalizovány převážně v centrální části tubulárního lumina.

Dalším typem pozorovaných struktur na řezu (obr. č. 3) byly již téměř hyalinizované tubuly. Tyto tubuly byly v lumenální části téměř zcela obliterovány tak, že vazivo tvořilo spíše stínové naznačení původních struktur. V centrální části u těchto degenerovaných, průměrem úzkých kanálků, byly navíc nalézány výrazně eozinofilní sraženiny. V intersticiu, především v okolí hyalinizovaných tubulů, byly nalezeny nepočetné hypertrofické Leydigovy buňky, které tvořily mikroadenomy. Naproti tomu v ostatních částech intersticia pozorovány nebyly. Fibroblasty intersticia byly koncentricky zmnožené především u degenerovaných tubulů. Základní hmota intersticia místy jevila výraznou eozinofilii.

V přehledném preparátu (obr. č. 4) měly tubuly nestandardní tvar a šířku, takže jsme nepozorovali typické uspořádání testikulárních sept.

Atypické kanálky v některých případech velmi zasahovaly do struktur nepravidelně uspořádané tunika albuginea (obr. č. 5).

Podobný obraz degenerace populace zárodečných buněk jsme pozorovali i u preparátů připravených z polosilných řezů (obr. č. 6). Nepravidelné průměry tubulů zachycených v podélné i příčné ose měly nestandardní šířku. Nápadným znakem bylo dobré zobrazení

zesílené hyalinizované bazální membrány a zastoupení světlých a tmavých typů Sertoliho buněk. Oproti parafinovým řezům byly lépe zachovány buněčné komponenty podpůrných buněk. Sporadicky bylo možné pozorovat i atypické formy spermatogonií. Nenacházeli jsme sraženiny, ale s genciánovou modří tvořily homogenní masu.

Kanátky, které podlehly degeneraci, měly výrazně zmnožené pojivové elementy a svaštělý tvar. Velmi často byl patrný postupný úbytek Sertoliho buněk (obr. č. 7).

#### 4.1.2. Hodnocení preparátů pravého hermafroditismu

Jako vzácný případ dokumentujeme oboustranného pravého hermafrodita, který měl gonádu tvořenou varletem a ovariální tkání, přičemž odvodné pohlavní cesty byly tvořeny vejcovody a rudimentární dělohou (obr. č. 8).

Přehledný řez byl charakterizován atypickou přítomností struktur obalu varlete (obr. č. 9). Ve vazivu tunika albuginea jsme pozorovali přítomnost testikulárních tubulů. Tkáň varlete byla tvořena nepravidelnými lalůčky oddělenými vazivovými septy. V lalůčkách byly pozorovány příčné průřezy testikulárních kanálků s redukováným průměrem. Intersticiem bylo rovněž výrazně redukováno. Testikulární tkáň měla charakter dysgenetické gonády.

V úzkých zárodečných kanálcích tvořily buněčné populace téměř výhradně nezralé formy Sertoliho elementů. Velmi vzácně jsme pozorovali fetální spermatogonie (obr. č. 10).

Intersticiální buňky byly přítomny (obr. č. 11).

V blízkosti těchto struktur bylo rovněž možné pozorovat vývodné struktury nadvarlete. V oblasti *rete testis* byly pozorovány atypicky uspořádané kanálky *epididymis* (obr. č. 12).

Na straně, kde byla část ovária, se diferencovaly vejcovody, které pokračovaly do hypoplastické dělohy (obr. č. 13).

Na polosilných řezech jsme mohli lépe pozorovat vnitřní vybavení stočených semenotvorných kanálků (obr. č. 14). Některé kanálky byly vybaveny početnými fetálními spermatogoniemi, které se místy diferencovaly do spermatocytů I. řádu (obr. č. 15). Takové kanálky byly již luminizovány.

Část gonády ženského typu obsahovala v korové části početnou populaci primordiálních folikulů fyziologického typu. Velké oválné jádro oocyty obsahovalo výrazné jadérko a chromatinová granula. Na polosilných řezech (obr. č. 16) bylo zřetelné nahromadění organel v blízkosti jádra. Celý útvar byl lemován plochou vrstvou folikulárních buněk.

Obr. č. 17 ukazuje fyziologické ovárium tvořící slupku gonády.



Obr. č. 18 ukazuje fyziologické oocyty.

Ve varleti hermafrodita byly sporadicky pozorovány struktury nacházející se v rozšířeném semenotvorném kanálku, tzv. „Call-Exnerova tělíska“ (obr. č. 19).

#### 4.1.3. Hodnocení dysgenetických preparátů

U dysgenetické gonády byly u varlete pozorovány vývodné kanálky s téměř fyziologickým uspořádáním buněčných komponent (obr. č. 20).

Základ mužské gonády byl makroskopicky tvořený nepravidelně ohraničeným ovoidním tvarem, který na řezu jevil atypické uspořádání testikulárních lalůčků. Tunika albuginea byla atypicky nepravidelně uspořádána. Toto uspořádání se výrazně lišilo svojí šířkou na obvodu. V oblasti tunika albuginea jsme pozorovali degenerované semenotvorné kanálky (obr. č. 21).

Testikulární kanálky měly průměr přibližně 150  $\mu\text{m}$ , jak je obvyklé u nedospělé gonády (obr. č. 22). Tyto kanálky lemovaly jemné bazální membrány. Buněčnou populaci tvořily především nezralé Sertoliho buňky. Sporadicky jsme pozorovali fetální spermatogonie. Intersticiem bylo abnormálně úzké. Leydigovy buňky jsme v našich preparátech nezaznamenali.

Pokud se stočené semenotvorné kanálky dostaly do vaziva ztlustěné tunikou albugineou, jevíly výrazné degenerativní znaky (obr. č. 23).

#### 4.1.4. Hodnocení kryptorchických preparátů

Na přehledném řezu klínovité excize (obr. č. 24 a 25) jsme pozorovali normální konfigurovanou strukturu tunika albuginea. Pod vazivem tuniky se nacházely příčné průřezy stočených semenotvorných kanálků, které měly přibližně fyziologické průměry. Bazální membrány, které je ohraničovaly, byly jemné, neztlustělé. Buněčné populace obsahu kanálků reprezentovaly převážně prekuzory Sertoliho buněk (nezralé buňky), které byly doplněny nepočetnými fetálními spermatogoniemi.

Přítomnost zárodečných buněk se velmi lišila v individuálních případech. Pro diagnózu byl velmi podstatný fakt, zda byla biopsie varlete provedena po předchozí terapii hormony. V takových případech byly pozorovány i stádia spermatocytů I. řádu. Navíc byly v intersticiu pozorovány aktivní formy Leydigových intersticiálních buněk.

## **5. DISKUZE**

Poruchy vývoje a diferenciace gonád u člověka jsou velmi závažným dějem, který začíná ihned po oplodnění vajíčka spermií. Tyto poruchy jsou známy velmi dlouho. Již Platón ve svém díle *Symposion* předpokládal existenci třech pohlaví – mužského, ženského a hermafrodita. O tom, zda se z nediferencované gonády vyvine testis nebo ovarium, rozhoduje karyotyp plodu.<sup>2</sup>

Ačkoliv pohlaví je dáno genetickou informací, teprve na začátku 7. týdne těhotenství se začínají diferencovat pohlavní orgány. V tomto období intrauterinního života má plod přítomny dva druhy vývodů - mezonefrický, který je důležitý pro vývoj mužského pohlavního ústrojí a dále paramezonefrický vývod nezbytný pro vývoj ženského pohlavního ústrojí.<sup>1,2,3,4</sup>

Nejdůležitější rozdíl mezi mužským a ženským vývojem gonád je, že proliferace spermatogonií je celoživotní, oproti proliferaci oogonií, která je limitovaná pouze na krátké prenatální období. Dle *Jirásky*, analýza morfogeneze nasvědčila, že časná diferenciace prvopohlavních buněk inhibuje téměř všechny geny spojené s diferenciací. Základní naprogramování prvopohlavních buněk souvisí s jejich migrací do gonád a s naprogramovaným počtem mitóz během meiózy.<sup>6</sup>

Víme, že pohlavní diferenciace je striktně kontrolována geneticky. S ohledem na pohlavní diferenciaci, je zde důležitý gen SRY na chromozomu Y, který vyvolává testikulární diferenciaci.<sup>6,9-11</sup> Jak ale uvádějí *Sekido R.* a *Lovell-Badge R.*, stále není jasné, jak je exprese genu SRY regulována.<sup>12</sup>

Děti narozené s nejednoznačnými genitáliemi dodnes představují složitý klinický problém vzhledem k heterogenitě fenotypových nálezů. Cílem systematického klinického vyšetření je určit produkci hormonů a ve kterých anatomických strukturách jsou přítomny, abychom pochopili, na jaké úrovni pohlavní diferenciace defekt vznikl; chromozomální, gonadální nebo na úrovni hormonální syntézy.

Histologická analýza biopsického materiálu od pacientů s poruchami vývoje gonád napomáhá v diagnostice a následném rozhodování o správné léčbě.

*Bertelloni et al.* uvádějí, že pacienti s Klinefelterovým syndromem mají vyvinuty Leydigovy buňky.<sup>21</sup> V našich preparátech ale byly nalezeny nepočetné hypertrofické Leydigovy buňky, které tvořily mikroadenomy, v ostatních částech intersticia pozorovány nebyly vůbec.

*Jirásek* popisuje specifický obraz testikulární dysgeneze vyznačující se výraznou hypoplazií varlete, jež má nedostatečně vyvinutou tenkou tuniku albugineu. Dále popisuje aberantní semenotvorné kanálky, které mají různý průměr a vždy obsahují spermatogonie.<sup>4</sup>

V našich preparátech jsme tenkou tuniku albugineu nezaznamenali. Spermatogonie jsme pozorovali spíše sporadicky.

*Kyu-Rae et al.* zjistili během své klinicko-patologické studie, že ačkoliv některé charakteristické vlastnosti u pravého hermafrodita napodobují gonadoblastom, jako je například celulární síť ukazující hyalinní Call-Exnerova tělíska, nebyly v jejich studii pozorovány.<sup>73</sup> V našich preparátech jsme měli možnost tyto struktury pozorovat.

S přibývajícím množstvím znalostí v této oblasti se otvírají nové diagnostické možnosti. Pohlavní vývoj vyžaduje vyváženou aktivaci transkripčních faktorů, signálních molekul a hormonů.

Epidemiologické studie také poukazují na skutečnost, že v reprodukci člověka se objevují nepříznivé faktory, které se alespoň částečně připisují vnějším faktorům, včetně změn životního stylu.<sup>2</sup>

Péče o pacienty s poruchami vývoje a diferenciací gonád zahrnuje velmi pečlivé určení pohlaví, patří sem také rozšířená genetická vyšetření a v neposlední řadě se dbá na psychologické aspekty pacienta.<sup>72</sup>

## **6. ZÁVĚR**

Popsali jsme charakteristiky etap normální diferenciace zevního i vnitřního genitálu včetně vývodných cest a osud prvopohlavních buněk, dále charakteristiky nejčastějších poruch ve vývoji a diferenciaci gonád u člověka, jako je Klinefelterův syndrom, pravý hermafroditismus, mužský pseudohermafroditismus a poruchy sestupu varlat (kryptorchismus). Na základě metod světelné mikroskopie jsme popsali histologický obraz příslušné diagnostické skupiny s charakteristickými patologickými rysy.

Histologicky jsme analyzovali bioptický materiál pacientů mužského pohlaví s poruchami vývoje gonád ve věku 2 až 12 let, který byl získán z archivního materiálu Laboratoře poruch rané ontogeneze Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze – Podolí a z Dětské kliniky FN v Hradci Králové.

Tato pozorování byla typická a ve shodě s literárními zdroji, které se zabývají histologickým hodnocením poruch vývoje a diferenciace gonád.

## **7. SEZNAM LITERATURY**

1. Heráček J., Urban M. a kol.: Urologie pro studenty [online], [cit. 10.08.2011], Androgeos, 2011
2. Lisá L. a kol.: Poruchy sexuální diferenciace, Maxdorf, Praha, 2001, s. 12 – 101
3. Dylevský I., Druga R., Mrázková O.: Funkční anatomie člověka, 1. vydání, Praha, Grada Publishing, 2000, s. 382, 398-399
4. Jirásek J. E.: Endokrinologie fetoplacentární jednotky, Avicentrum, 1977, s. 73 – 117
5. <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/gonocyty>, červenec, 2011
6. Jirásek J. E.: Normal Sex Differentiation, 2008, DOI 10.3843/GLOWM. 10346
7. Pergamen E. et al: Sexual differentiation and preimplantation cell growth. Hum. Reprod. 9, 1994, s. 1730-1732
8. [http://user.mendelu.cz/urban/vsg\\_1/mendel/pdf/15\\_genetika\\_pohlavi.pdf](http://user.mendelu.cz/urban/vsg_1/mendel/pdf/15_genetika_pohlavi.pdf), červenec, 2011
9. Sinclair A. H. et al: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 346: 1990, s. 240–244
10. Berta P. et al: Genetic evidence equating SRY and the testis determining factor. Nature 348: 1990, s. 448–450
11. Giese K., Page J., Grosschedl R.: Distinct DNA-binding properties of HMG domain of murine and human SRY. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1994, s. 3368–3372
12. Sekido R., Lovell-Badge R.: Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge, Trends. Genet., Vol. 25, 2009, s. 19-29
13. [http://www.genedx.com/services/dis\\_xy.php](http://www.genedx.com/services/dis_xy.php), červenec 2011
14. Sinclair A. H., Berta P., Palmer M. S. et al.: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature, 1990, 240-244
15. Hawkins J. R.: Genetics and Biochemistry of Sex Determination. Topical Endocrinology, suppl 3., s. 16-17
16. Grumbach M. M., Conte F. A.: Williams Textbook of Endocrinology, 1992, s. 853-951
17. Pokrivčák T.: Syndromy a symptomy, Praha, Triton, 2009, s. 187
18. Bardoni B., Zanaria E., Dabovic B. et al.: Turner Syndrome in a Life Span Perspective. Research and Clinical Aspects, Elsevier Sc. B. V., 1995, s. 41-56
19. Zvěřina J.: Plodnost muže a její poruchy, Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha, 2010, s. 33



20. Wikström A. M., Dunkel L.: Klinefelter syndrome, *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011, s. 239-50
21. Bertelloni S., Baroncelli G. I., Battini R. et al.: Central precocious puberty in Klinefelter syndrome. A case report with longitudinal follow-up of growth pattern. *Am. J. Med. Genet.*, 1996, s. 52-55
22. Rosenfeld R. G.: Henry H. Turner 1892 – 1970, Historical Note. *The Endocrinologist*, 1977, vol. 5, s. 327-328
23. Turner H. H.: A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. *Endocrinology*, 1938, vol. 23, s. 566-572
24. Hall J. G., Lopez-Rangel E.: Turner Syndrome in a Life Span Perspective: Research and Clinical Aspects, Elsevier Sc. B. V., 1995, s. 3-9
25. Held K. R., Kerber S., Kaminsky E. et al.: Turner Syndrome: Growth Promoting Therapies. *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1991, s. 15-23
26. Chu C. E., Donaldson M. D. C., Connor J. M.: Molecular Basis of Endocrine Diseases. *Ares Sero Symposia*, 1994, s. 97-103
27. Saenger P.: Clinical manifestations and diagnosis of Turner syndrome (gonadal dysgenesis), Up ToDate, <http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-turner-syndrome-gonadal-dysgenesis#top>, červenec 2011
28. Zapletalová J., Lebl J.: Turnerův syndrom, 2. vydání, Maxdorf, Praha, 2005
29. Kastrup K. W., Naeraa R., Nielsen J.: Turner Syndrome: Growth Promoting Therapies. *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1991, s. 175-179
30. Schmitt K., Schober E., Birnbacher R. et al.: Behavior of growth hormone after stimulation with growth hormone releasing hormone (GHRH) in children with disorders of the hypothalamo-hypophyseal axis and girls with Turner syndrome. *Klin. Pediatr.*, 1996, Vol. 208, s. 29-34
31. Rao E., Weiss B., Fukurami M. et al.: Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat. Genet.*, 1997, Vol. 16, s. 54-63
32. Ellison J. W., Wardak Z., Young M. F. et al.: PHOG, a candidate gene for involvement with the short stature of Turner syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 1997, Vol. 6, s. 1341-1347
33. Di Pinto D., Balestracci A., Dujovne N. et al.: Nephrourologic pathology in girls with Turner syndrome, *Arch. Argent. Pediatr.*, 2010, Vol. 108, s. 353-57

34. Morgan T.: Turner syndrome: diagnosis and management. *Am. Fam. Physician.* 2007, Vol. 76, s. 405-410.
35. Carreau S.: Cell and molecular Biology of the Testis. *Serono Symp. Publ.*, 1994, s. 137-154
36. Pilgrim C., Reisert I.: Sex differentiation: Clinical and Biological Aspects. *Serono Symp. Publ.*, 1996, s. 125-134
37. Sharpe R. M., Majdic G., Fisher J. et al.: Sex differentiations: Clinical and Biological Aspects., 1996, s. 181-193
38. Canto P., Soderlund D., Reyes E., Mendéz J. P.: Mutation in the Desert hedgehog (DHH) Gene in Patients with 46,XY Complete Pure Gonadal Dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, Vol. 89, s. 4480-4483
39. <http://embryology.med.unsw.edu.au/OMIMfind/gonad/OMIM-306100.htm>, červenec 2011
40. Conte F. A., Grumbach M. M.: Sex Differentiation: Clinical and Biological Aspects. *Serono Symp. Publ.*, 1996, s. 153-172
41. David M., Nicolino M., Forest M. G.: Growth patterns in 15 patients presenting with mixed gonadal dysgenesis: catch-up growth hormone treatment and implication in the choice of rearity. *Nordisk hGH Symposium, Mannheim*, 1997
42. Sauer M. V., Lobo R. A., Paulson R. J.: Successful twin pregnancy after embryo donation to a patient with XY gonadal dysgenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1989, Vol. 161, s. 380-381
43. Müller U.: Molecular Basis of Endocrine Diseases. *Serono Symp. Publ.*, 1994, s. 75-86
44. Voutilainen R.: *Development Endocrinology*, 1994, s. 141-146
45. Hutson J. M., Donahoe P. K.: The hormonal control of testicular descent. *Endocr. Rev.*, 1986, Vol. 7, s. 270-283
46. Klebs E.: *Handbuch der pathologischen Anatomie*. Berlin: Hirschwald, 1876
47. Simpson, J. L.: True hermaphroditism, 2008, DOI 10.3843/GLOWM.10353
48. Harnden D. G., Armstrong CN: The chromosomes of a true hermaphrodite. *Br. Med. J.*: 1959, Vol. 2, s. 1287
49. Hungerford D. A., Donnelly A. J., Nowell P. C., Beck S.: The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. *Am. J. Hum. Genet.*, 1959, Vol. 11, s. 215

50. Simpson J. L.: True hermaphroditism: Etiology and phenotypic considerations. *Birth Defects*, Vol. 14, 1978, s. 9
51. Stárka L.: *Repetitorium Endokrinologie*, Praha, Triton, 2009
52. Mystkowska E. T., Tarkowski A. K.: Observations on CBA-P/CBA-T<sub>6</sub> T<sub>6</sub> mouse chimeras. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1968, Vol. 20, s. 33
53. Simpson J. L.: *Disorders of Sexual Differentiation: Etiology and Clinical Delineation*. New York: Academic Press, 1976
54. Byrd J. R., Tho P. T., Otken L.: Gonadoblastoma in a true hermaphrodite with a 46,XX Karyotype. *Obstet Gynecol*, 1976, Vol. 46, s. 355
55. Loche S., New M.: *Congenital Adrenal Hyperplasia: Female Pseudohermaphroditism and Virilization*, 2008; DOI 10.3843/GLOWM.10348
56. Jost A.: Steroids and sex differentiation of the mammalian fetus. *Excerpta Medica International Congress Series*, 1996, Vol. 132, s. 74
57. Josso N.: *Differentiation of the Genital Tract: Stimulators and Inhibitors*, New York, Academic Press, 1981, s. 165–203
58. Wilkins L.: *Abnormal Sex Differentiation: Hermaphroditism and Gonadal Dysgenesis*, Springfield I. L., Charles C. Thomas, 1965, s. 297–338
59. White P. C., New M. I., Dupont B.: Congenital adrenal hyperplasia (1). *N. Engl. J. Med.*: 1987, Vol. 316, s. 1519
60. White P. C., New M. I., Dupont B.: Congenital adrenal hyperplasia (2). *N. Engl. J. Med.*: 1987, Vol. 316, s. 1580,
61. New M. I., White P. C., Pang S. et al.: *The Adrenal Hyperplasias*, New York, McGraw - Hill, 1989, s. 1881–1917.
62. Wilkins L., Lewis R., Klein R. et al.: The suppression of androgen secretion by cortisone in a case of congenital adrenal hyperplasia. *Johns Hopkins Hospital Bulletin*: 1950, Vol. 86, s. 249
63. Bartter F.: *Congenital Adrenal Hyperplasia*, Baltimore, University Park Press, 1977
64. Simpson J. L.: Disorders of the gonads, genital tract, and genitalia. In Rimoin D. L., Connor J. M., Pyeritz R. E. (eds.): *Principles and Practice of Medical Genetics*. 5th ed. New York, 2007, s. 2055 - 2092
65. Simpson J. L., Elias S.: *Genetics in Obstetrics and Gynecology*. 3rd ed., Philadelphia, 2003
66. Simpson J. L., Rebar R.W.: Normal and abnormal sexual differentiation and development. In: Becker K. L., Bilezikian J. P., Bremner W. J. et al.: *Principles and*

Practise of Endocrinology and metabolism, 2nd ed, Philadelphia, J. B. Lippincott, 1995, s. 788-822.

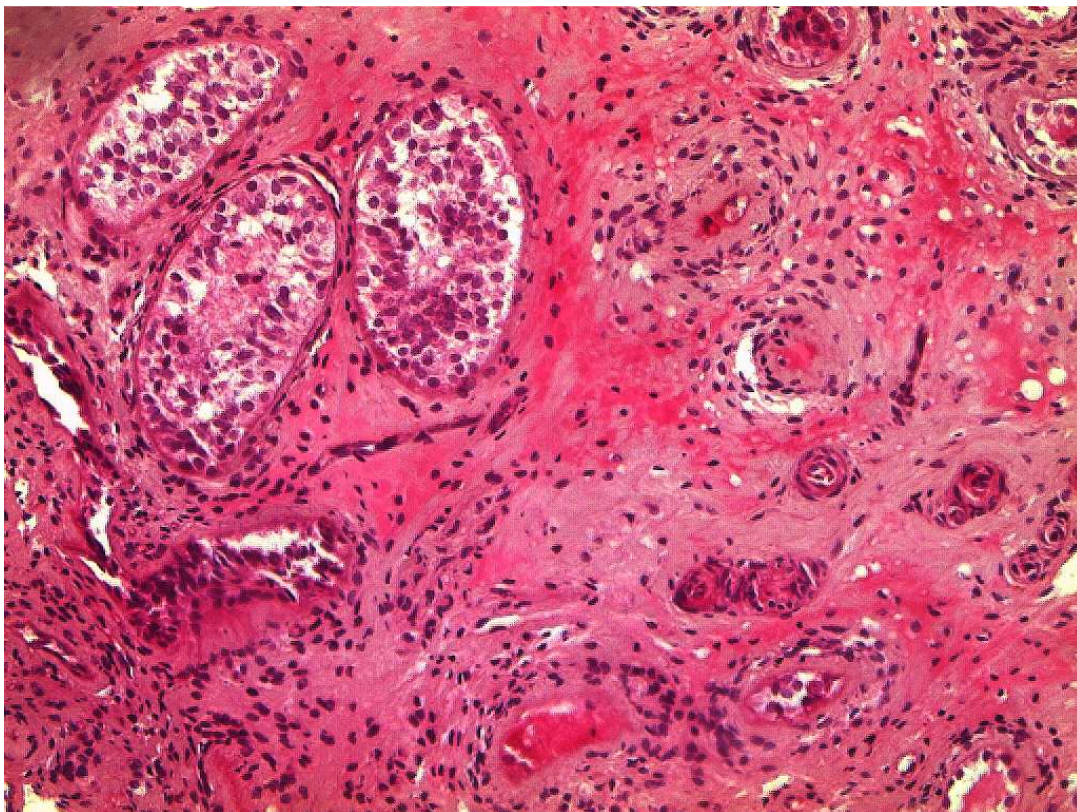
67. Simpson J.: Male Pseudohermaphroditism Due to Androgen Insensitivity or 5 $\alpha$ -Reductase Deficiency, 2008, DOI 10.3843/GLOWM.10349
68. Ashley R. A., Barthold J. S., Kolon T. F.: Cryptorchidism: Pathogenesis, Diagnosis, Treatment and Prognosis Urologic Clinics of North America, Pediatric Urology, Vol. 37, s. 183-193,
69. Poršová – Dutoid, I.: Mužský hypogonadismus, Maxdorf, Praha, 2004, s. 11-83
70. Čihák, R.: Anatomie 2, 1. vydání. Avicenum, Praha, 1988, s. 268-280
71. Docimo S., Silver R., Cromie W.: The Undescended Testicle: Diagnosis and Management. J. Am. Fam. Physician, 2000, Vol. 62, s. 9
72. Barbaro M., Wedell A., Nordenstrom A.: Disorders of sex development. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine, 2011, Vol. 16, , s. 119-127
73. Kyu-Rae K. et al.: True Hermaphroditism and Mixed Gonadal Dysgenesis in Young Children: A Clinicopathologic Study of 10 Cases. Mod. Pathol. 2002; Vol. 15, s. 1013–1019

## **8. OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA**

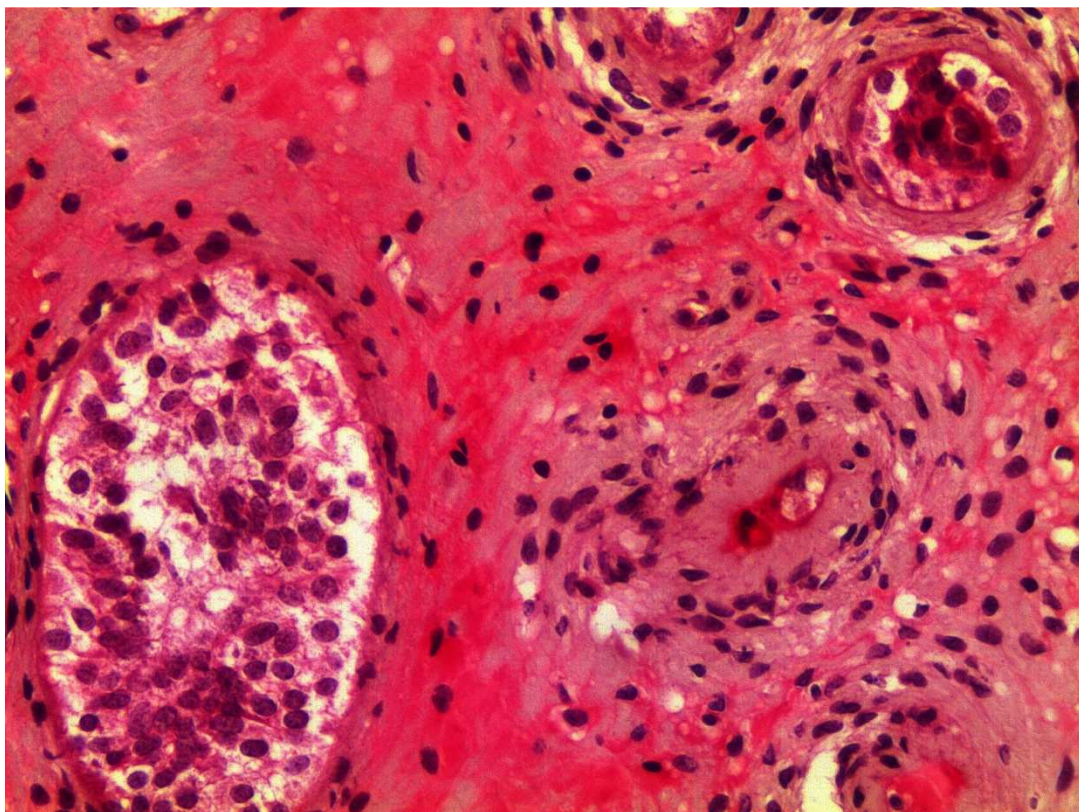
### Seznam obrázků:

- Obrázek 1 – Klinefelterův syndrom, varle, HE, 100 x
- Obrázek 2 - Klinefelterův syndrom, varle, HE, 200 x
- Obrázek 3 - Klinefelterův syndrom, varle, HE, 200 x
- Obrázek 4 - Klinefelterův syndrom, varle, barvení polosilných řezů, 100 x
- Obrázek 5 - Klinefelterův syndrom, varle, barvení polosilných řezů, 100 x
- Obrázek 6 - Klinefelterův syndrom, varle, barvení polosilných řezů, 400 x
- Obrázek 7 - Klinefelterův syndrom, varle, barvení polosilných řezů, 400 x
- Obrázek 8 – Pravý hermafroditismus, vejcovod, ZT, 400 x
- Obrázek 9 - Pravý hermafroditismus, varle, ZT, 40 x
- Obrázek 10 - Pravý hermafroditismus, varle, ZT, 200 x
- Obrázek 11 - Pravý hermafroditismus, varle, ZT, 200 x
- Obrázek 12 - Pravý hermafroditismus, epididymis, HE, 40 x
- Obrázek 13 - Pravý hermafroditismus, uterus, HE, 40 x
- Obrázek 14 - Pravý hermafroditismus, varle, barvení polosilných řezů, 100 x
- Obrázek 15 - Pravý hermafroditismus, varle, barvení polosilných řezů, 400 x
- Obrázek 16 - Pravý hermafroditismus, ovarium, barvení polosilných řezů, 200 x
- Obrázek 17 - Pravý hermafroditismus, ovarium, barvení polosilných řezů, 100 x
- Obrázek 18 - Pravý hermafroditismus, ovarium, barvení polosilných řezů, 400 x
- Obrázek 19 - Pravý hermafroditismus, varle, HE, 200 x
- Obrázek 20 – Dysgeneze, nadvarle, HE, 100 x
- Obrázek 21 – Dysgeneze, varle, HE, 40 x
- Obrázek 22 – Dysgeneze, varle, HE, 100 x
- Obrázek 23 – Dysgeneze, varle, HE, 100 x
- Obrázek 24 – Kryptorchismus, varle, HE, 40 x
- Obrázek 25 – Kryptorchismus, varle, HE, 200 x



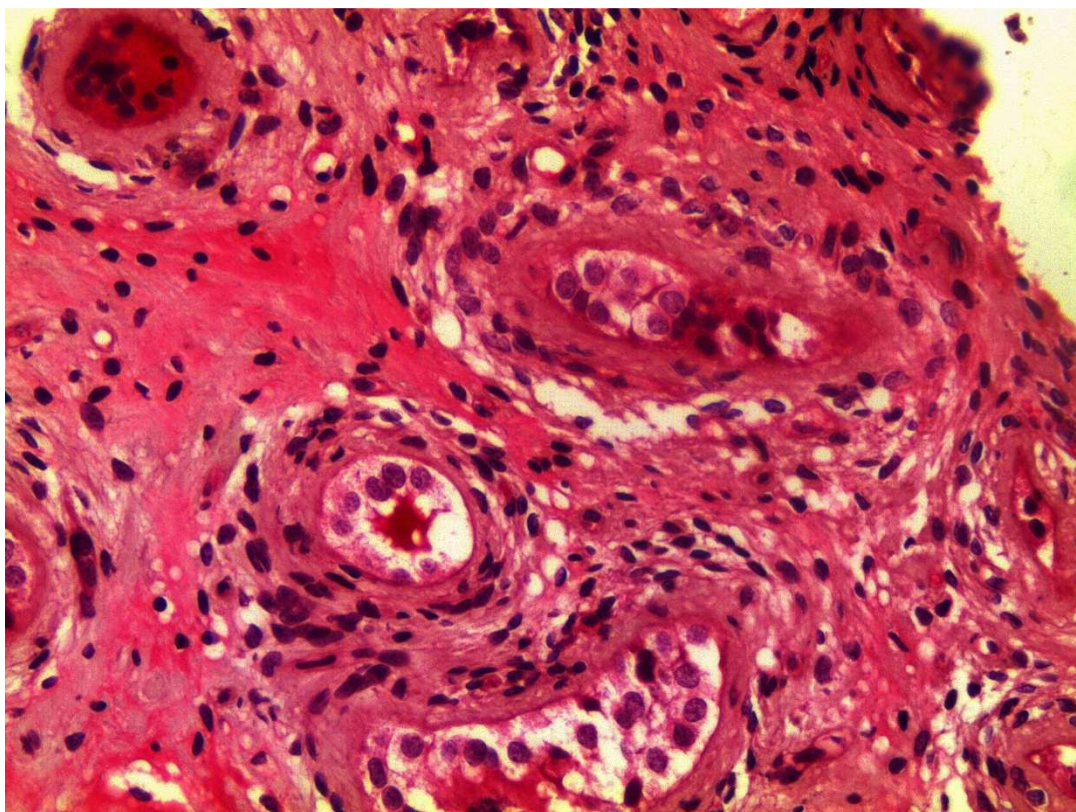


Obr. č. 1: Přehledný řez semenotvornými kanálky u prepubertálního Klinefelterova syndromu, HE, zvětšeno 100 x

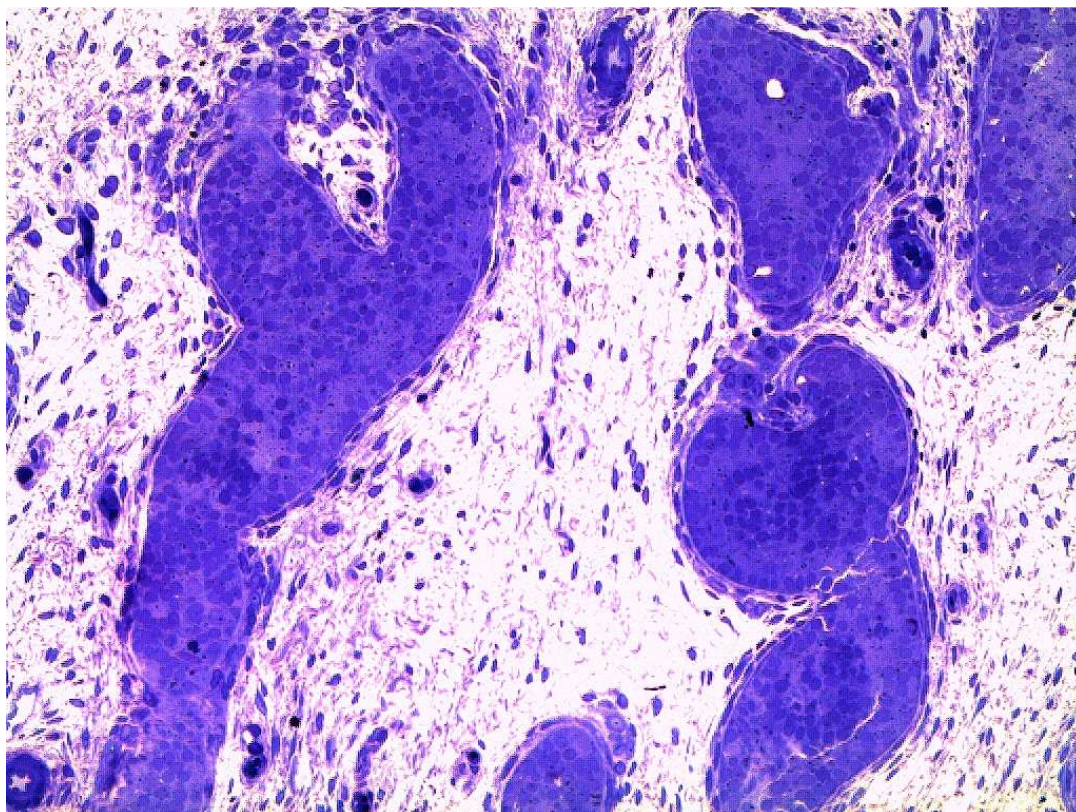


Obr. č. 2: Detailní pohled na semenotvorné kanálky u prepubertálního Klinefelterova syndromu, HE, zvětšeno 200 x



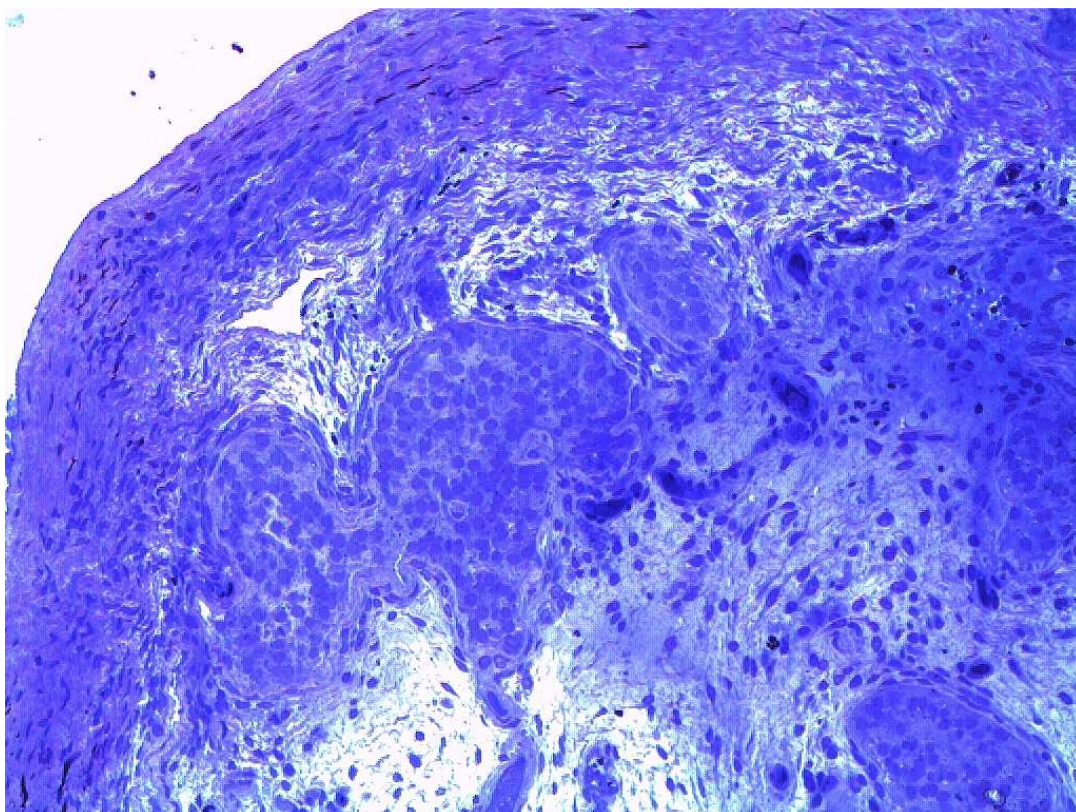


Obr. č. 3: Pohled na hyalinizované tubuly semenotvorných kanálků u prepubertálního Klinefelterova syndromu, HE, zvětšeno 200 x

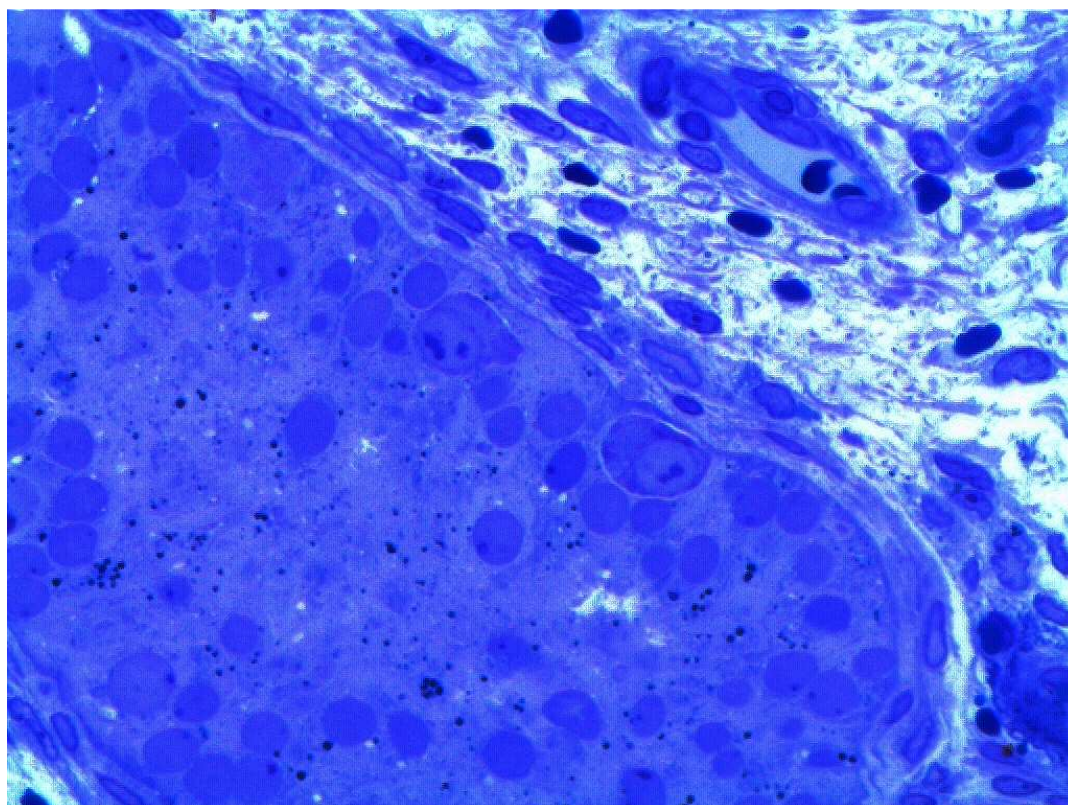


Obr. č. 4: Přehledný řez semenotvorných kanálků u Klinefelterova syndromu, barvení polosilných řezů, zvětšení 100 x



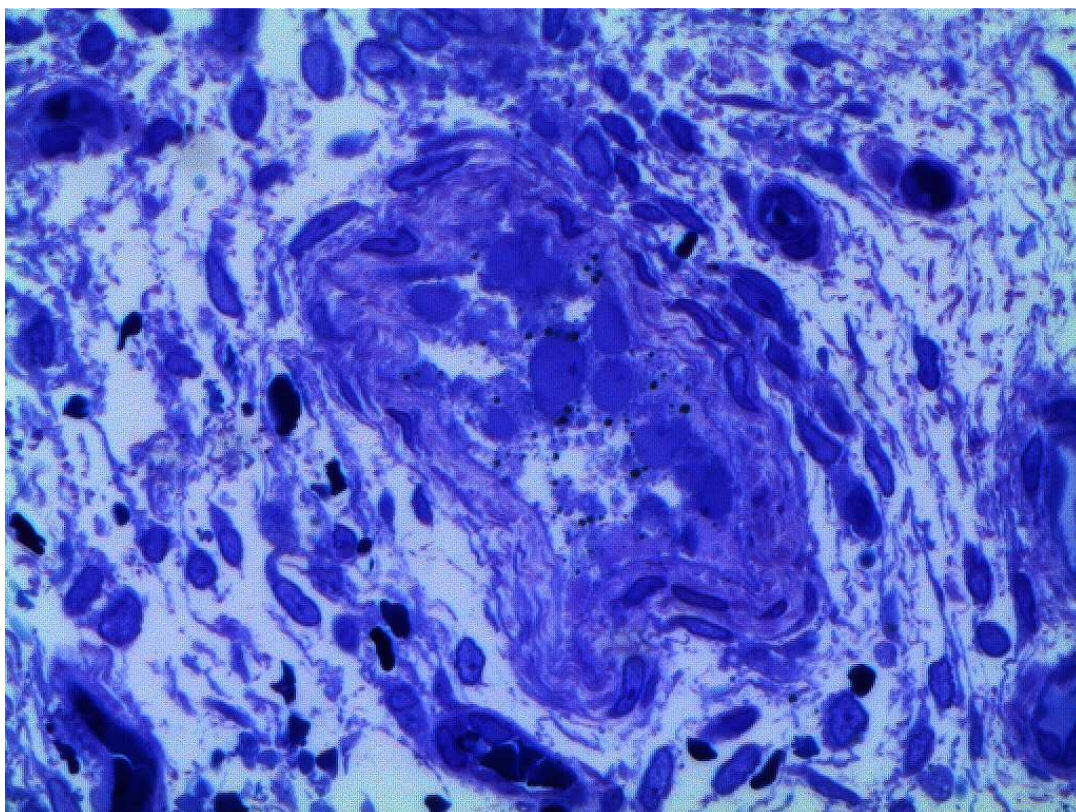


Obr. č. 5: Tunika albuginea u Klinefelterova syndromu, barvení polosilných řezů, zvětšení 100 x

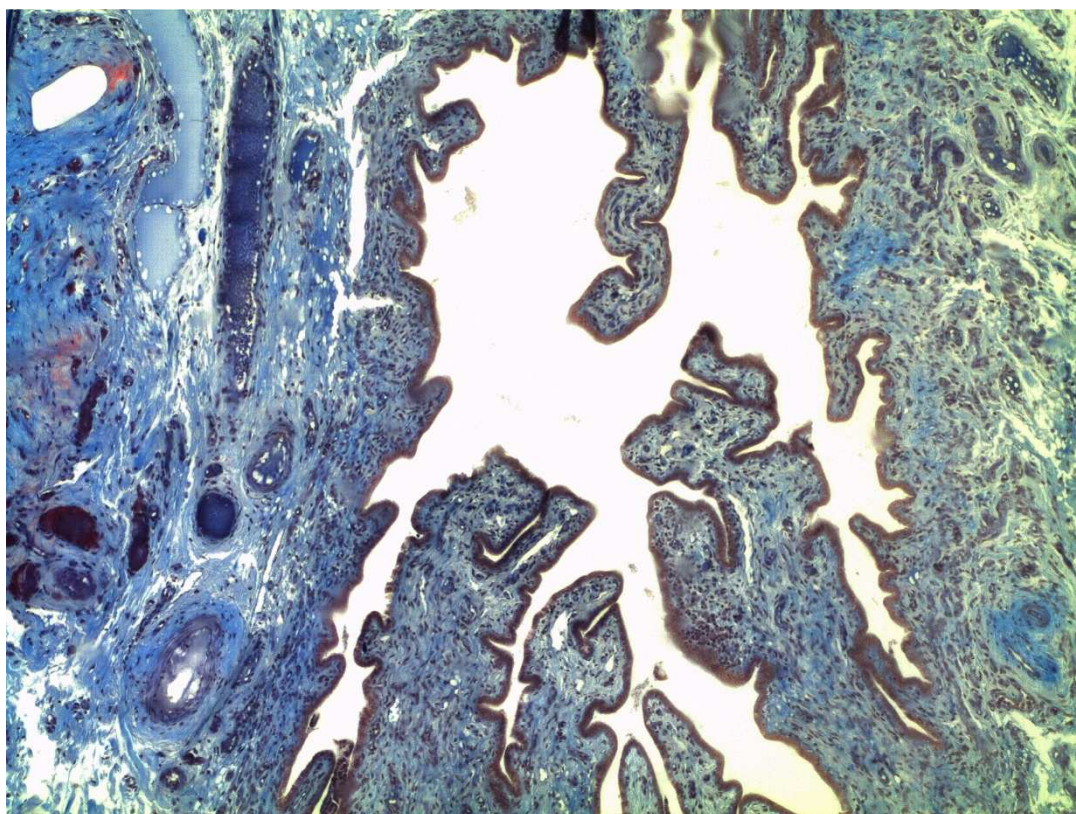


Obr. č. 6: Detailní pohled na semenotvorné kanálky se zbytkem spermatogonií u Klinefelterova syndromu, barvení polosilných řezů, zvětšení 400 x



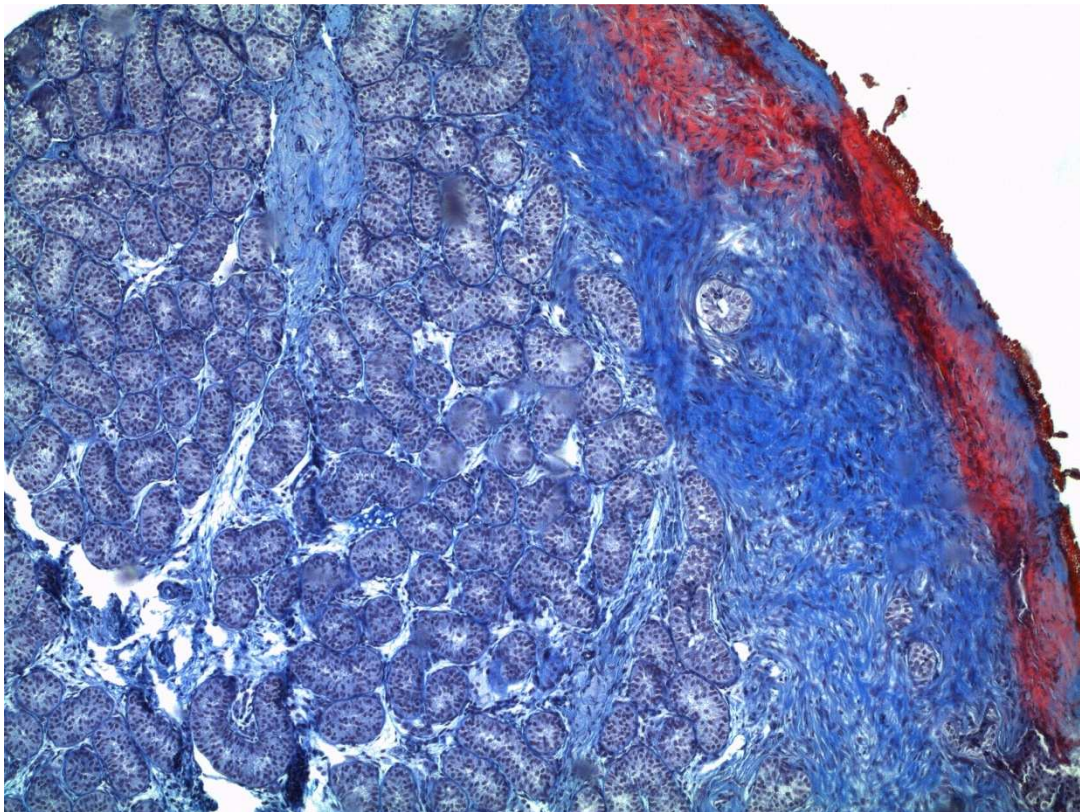


Obr. č. 7: Detailní pohled na semenotvorné kanálky u Klinefelterova syndromu se zmnoženou pojivovou tkání, barvení polosilných řezů, zvětšení 400 x

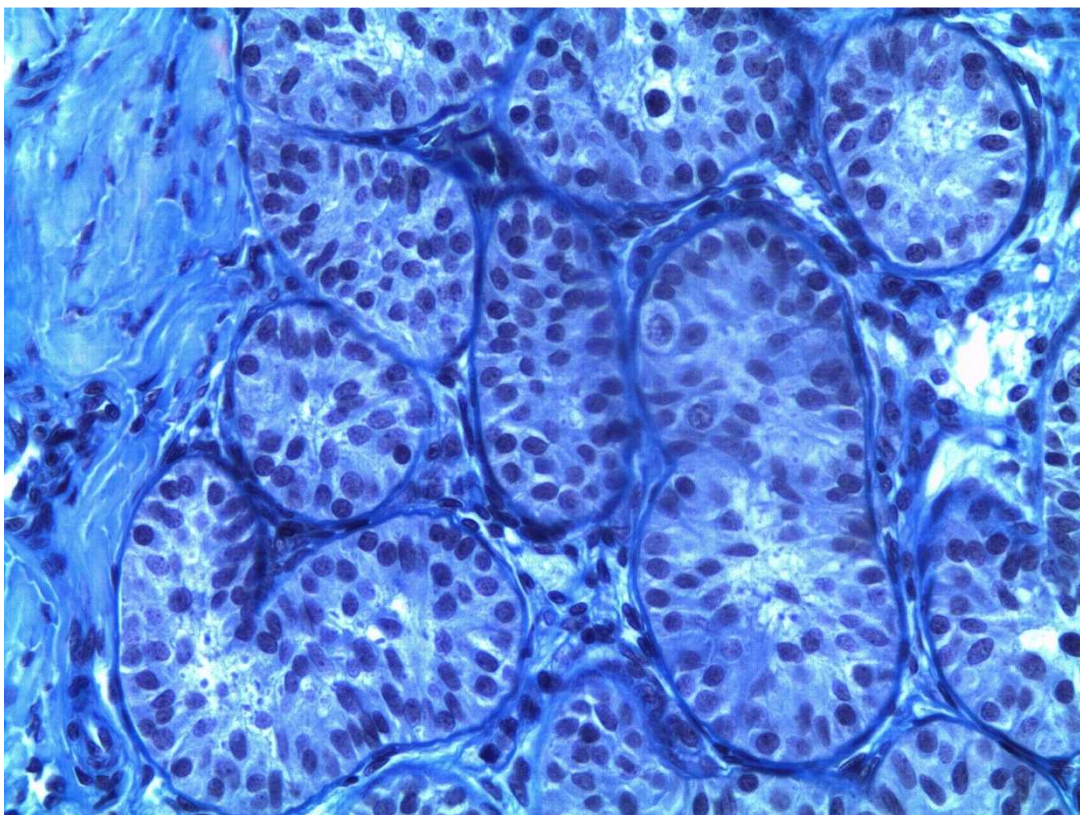


Obr. č. 8: Detailní obraz vejcovodu u pravého hermafroditismu, ZT, zvětšení 400 x



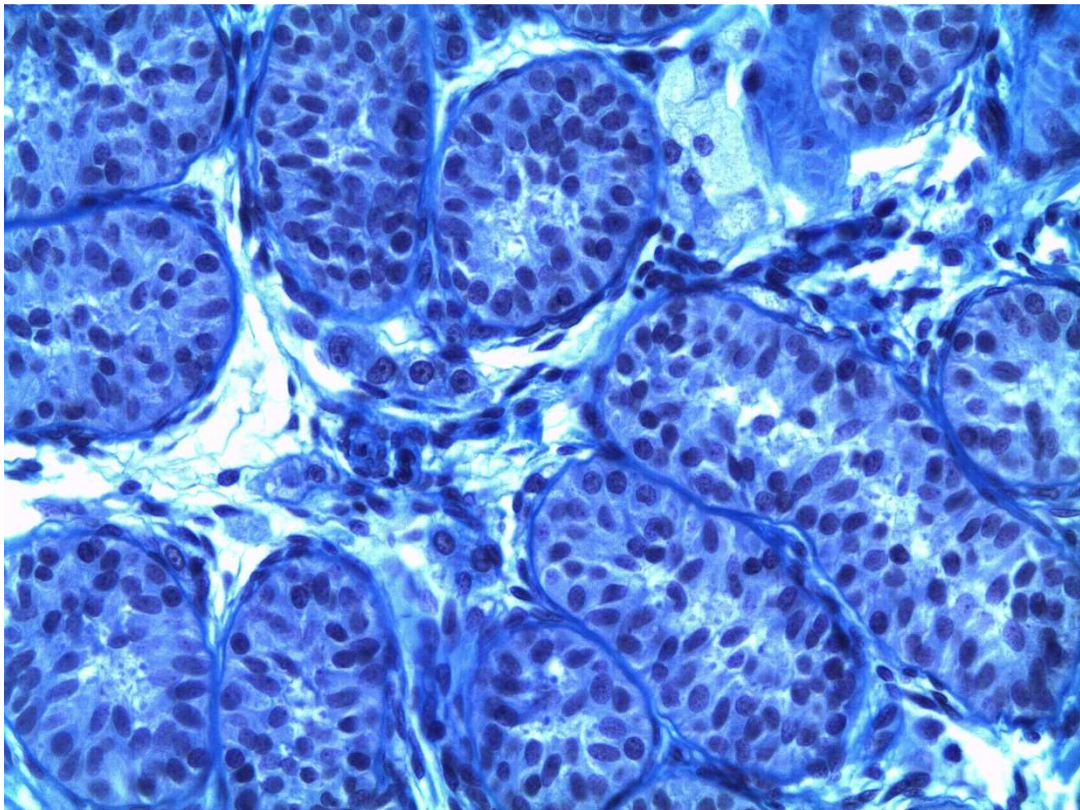


Obr. č. 9: Řez varletem u pravého hermafroditismu s redukovaným intersticiem, ZT, zvětšení 40 x

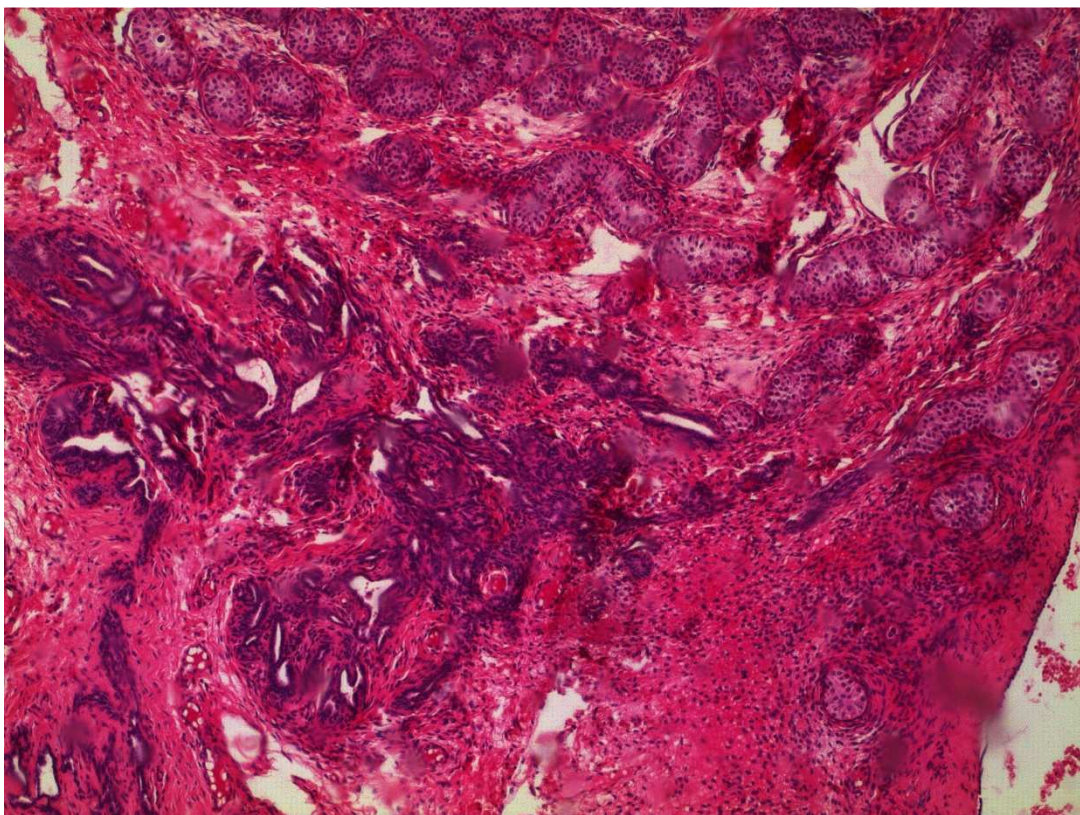


Obr. č. 10: Řez varletem s nezralými formami Sertoliho buněk, ZT, zvětšení 200 x



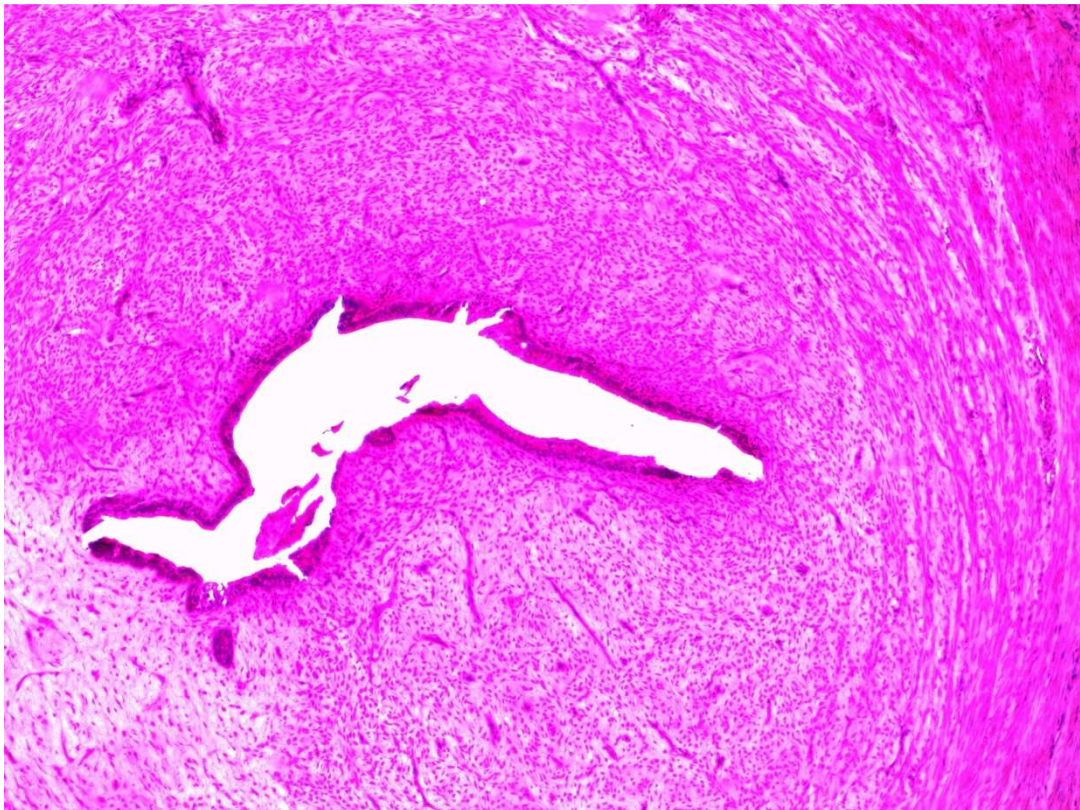


Obr. č. 11: Pohled na intersticiu u pravého hermafroditismu, ZT, zvětšení 200 x

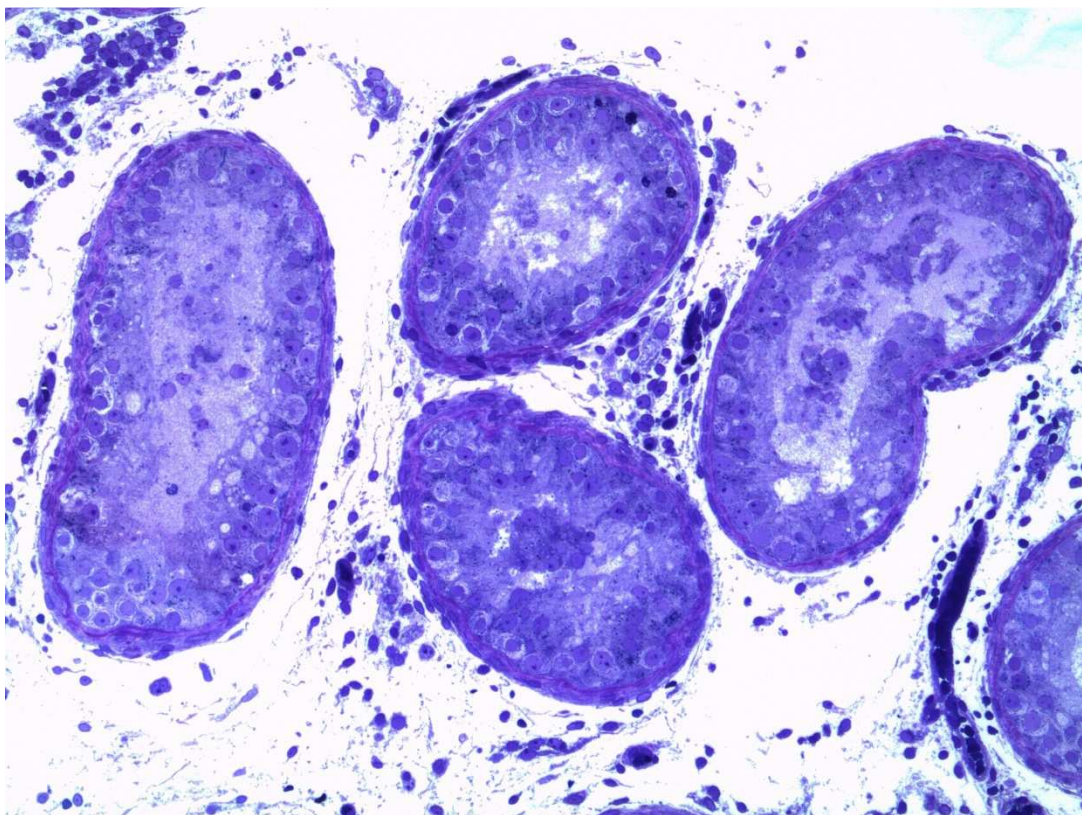


Obr. č. 12: Pohled na atypicky uspořádané epididymis u pravého hermafroditismu, HE, zvětšení 40 x



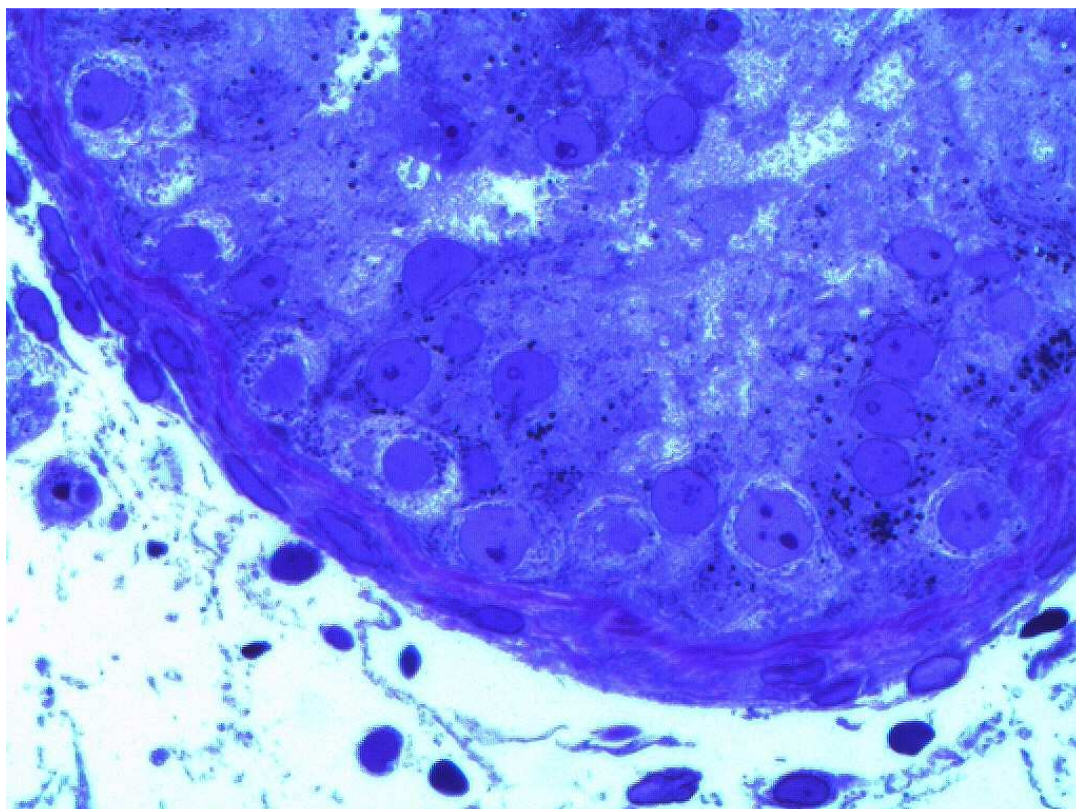


Obr. č. 13: Přehledný pohled na uterus u pravého hermafroditismu, HE, zvětšení 40 x

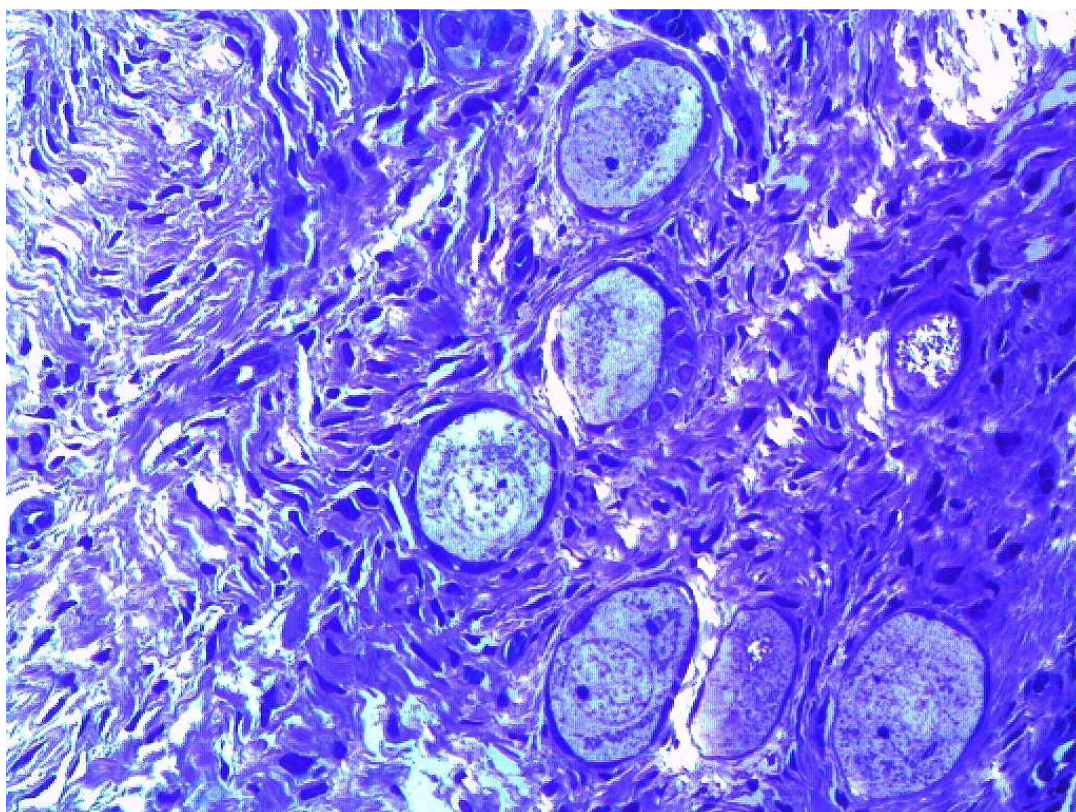


Obr. č. 14: Přehledný řez varletem u pravého hermafroditismu, barvení polosilných řezů, zvětšení 100 x



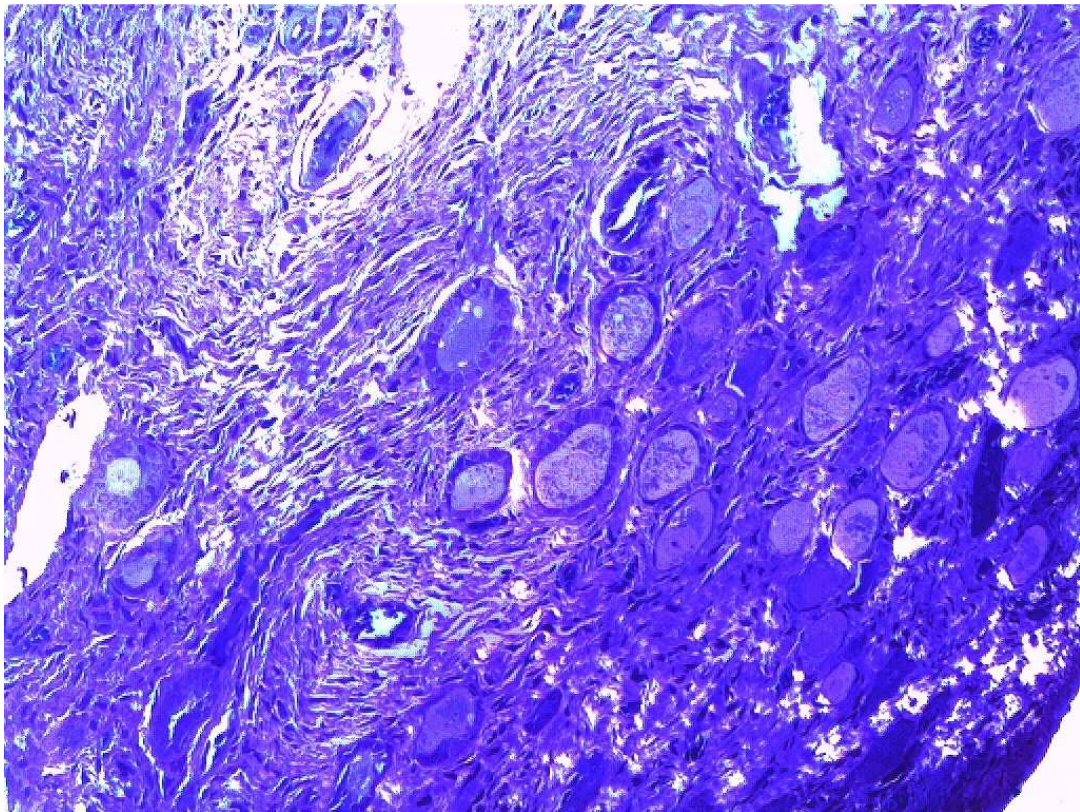


Obr. č. 15: Detailní pohled na různá stádia mladých spermatocytů u pravého hermafroditismu, barvení polosilných řezů, zvětšení 400 x

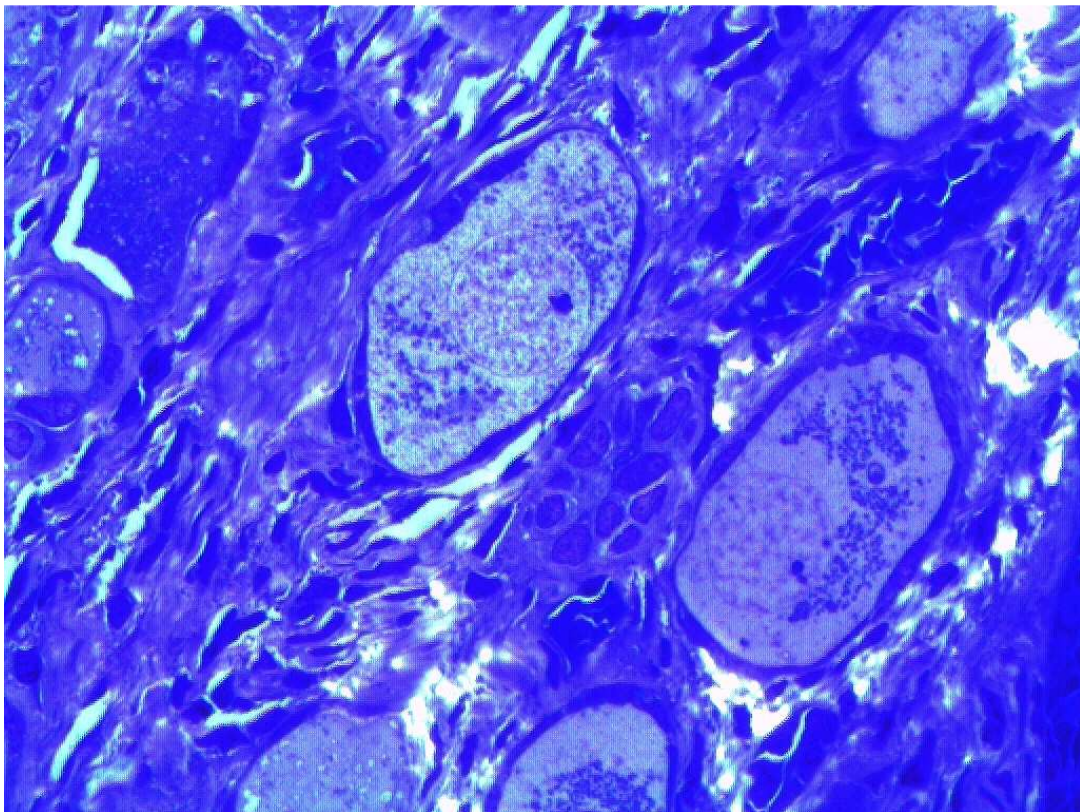


Obr. č. 16: Detailní pohled na oocyt se zřetelným nahromaděním organel v blízkosti jádra u pravého hermafroditismu, barvení polosilných řezů, zvětšení 200 x



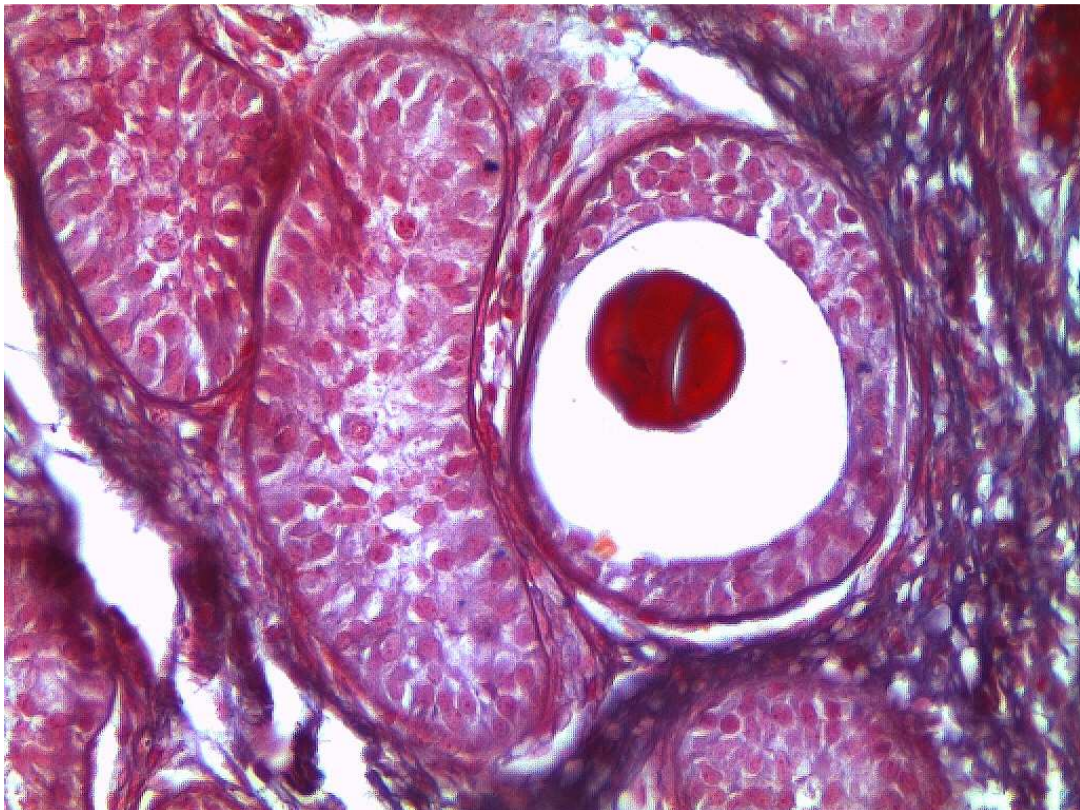


Obr. č. 17: Přehledný obraz fyziologického ovaria tvořící slupku gonády u pravého hermafroditismu, barvení polosilných řezů, zvětšení 100 x

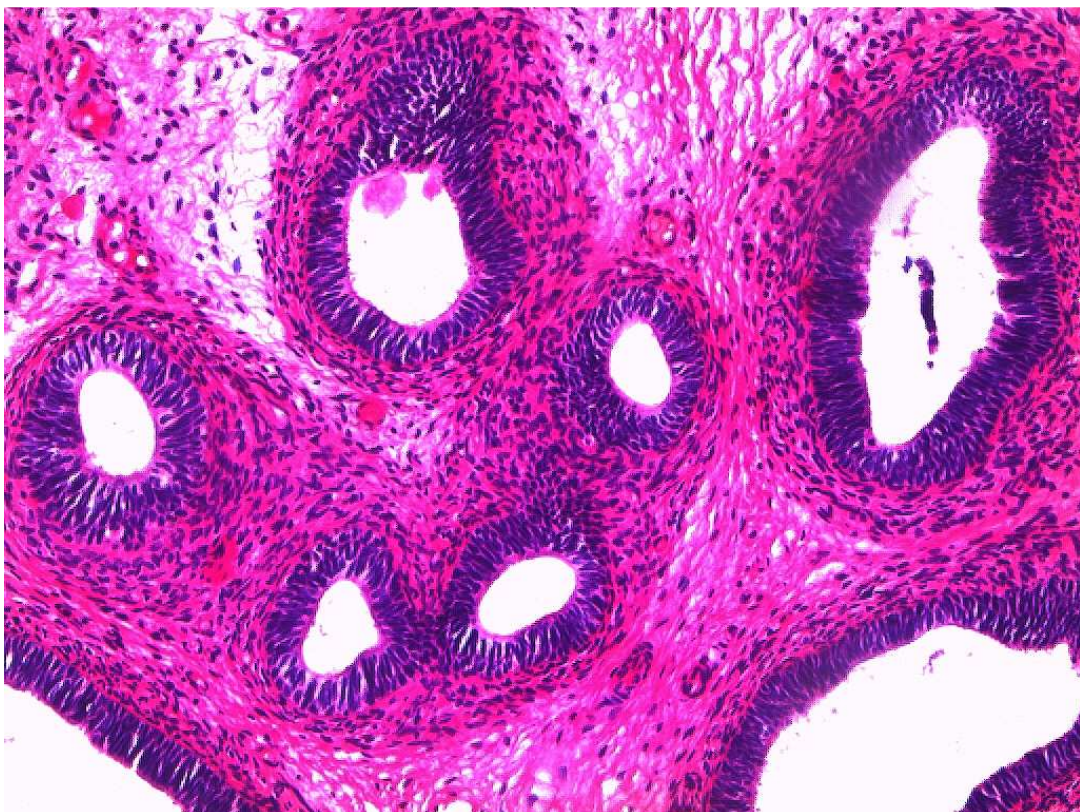


Obr. č. 18: Detailní pohled na fyziologické oocyty u pravého hermafroditismu, barvení polosilných řezů, zvětšení 400 x





Obr. č. 19: Pohled na Call – Exnerova tělíska ve varleti pravého hermafrodita, HE, zvětšení 200 x

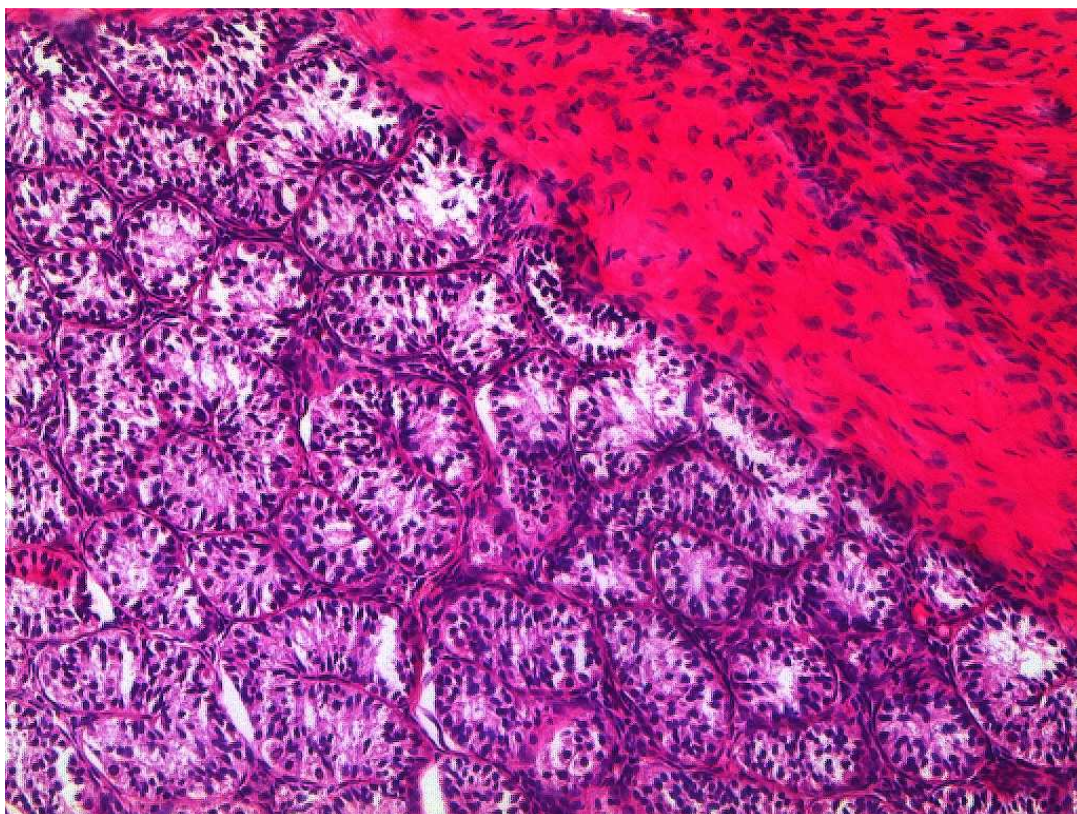


Obr. č. 20: Přehledný obraz vývodných kanálků nadvarlete u dysgenetické gonády, HE, zvětšení 100 x



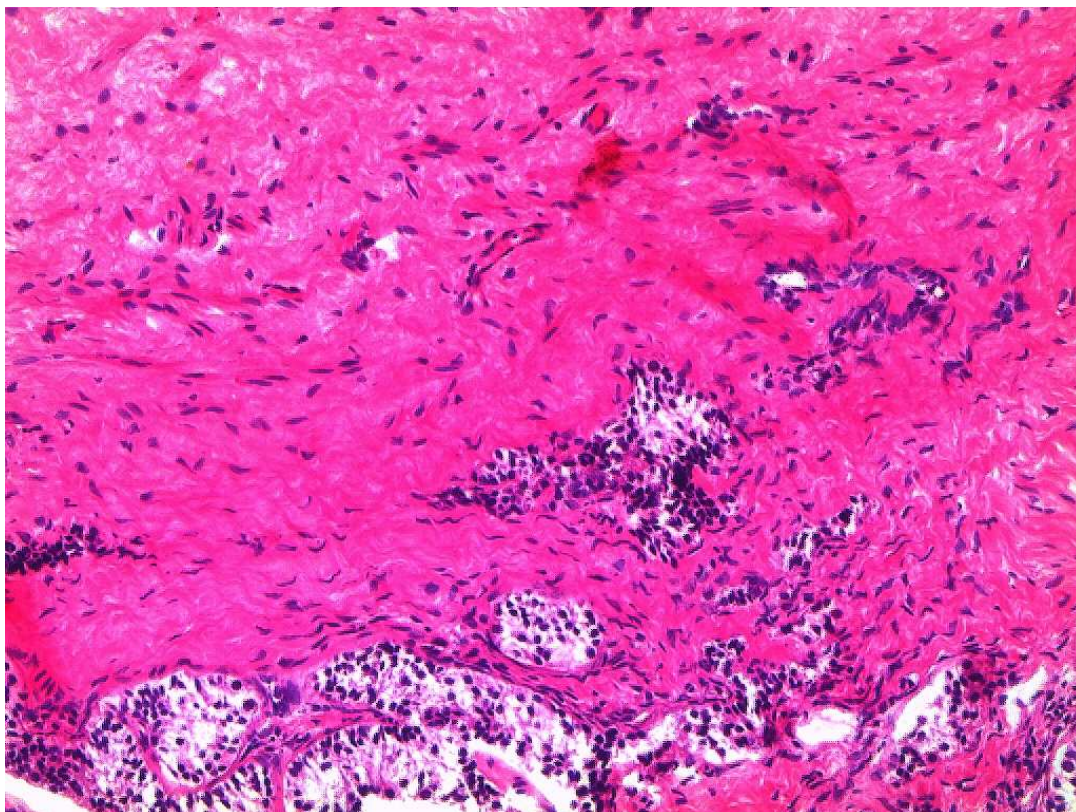


Obr. č. 21: Atypicky nepravidelně uspořádaná tunika albuginea u mužské gonády, HE, zvětšení 40 x

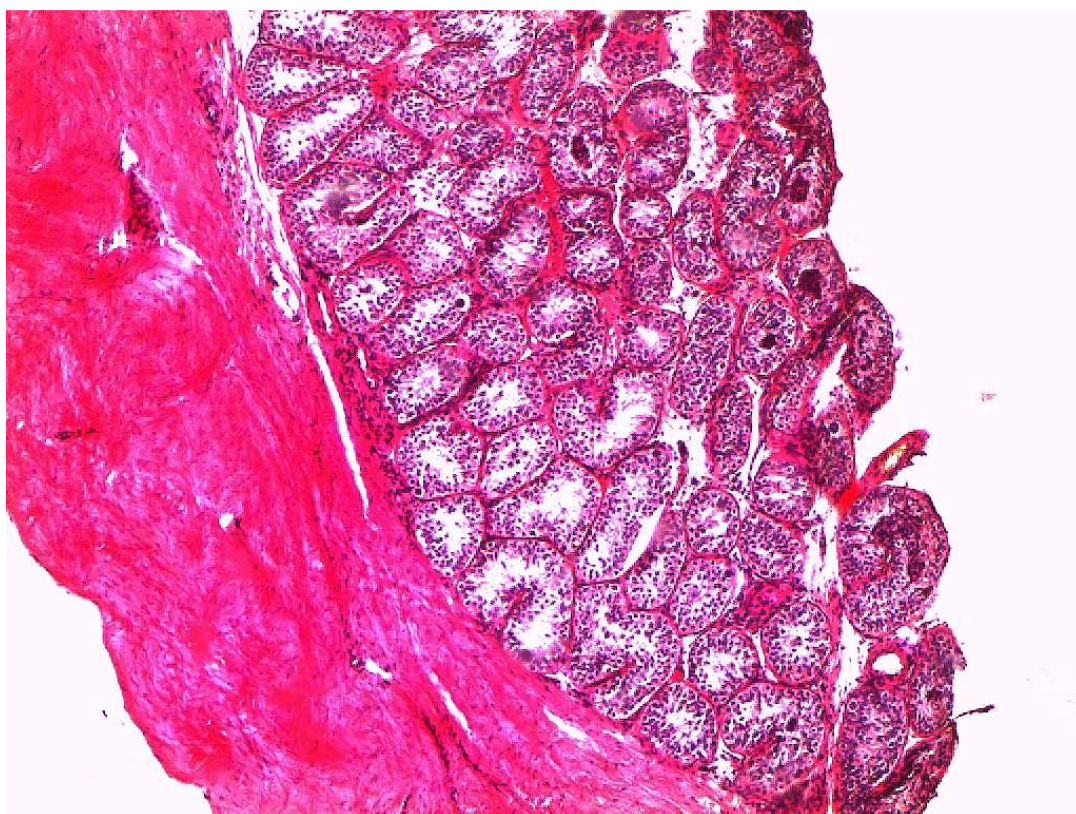


Obr. č. 22: Přehledný obraz varlete u dysgenetické gonády, HE, zvětšení 100 x



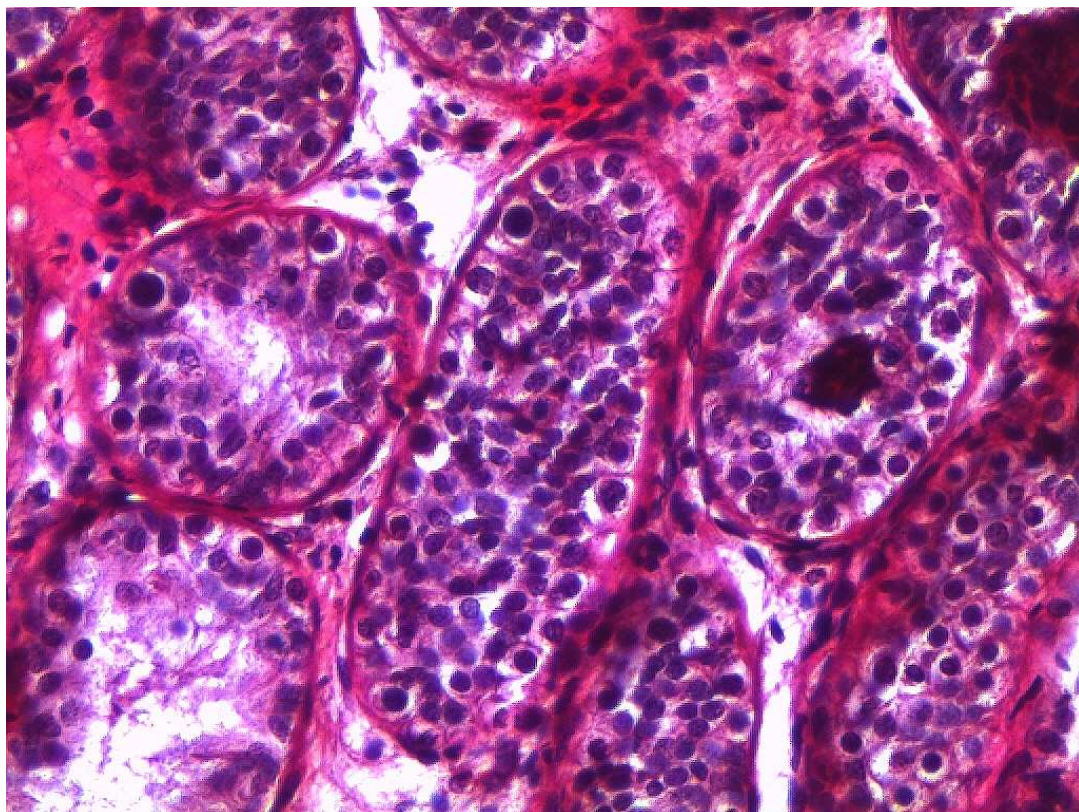


Obr. č. 23: Pohled na degenerované stočené semenotvorné kanálky varlete, HE, zvětšení 100 x



Obr. č. 24: Přehledný řez klínovité excize kryptorchického varlete, HE, zvětšení 40 x





Obr. č. 25: Pohled na kryptorchické varle, HE, zvětšení 200 x